



Yellow Fluorescent Protein : étude du π stacking : élaboration d'un modèle du déclin de fluorescence

Karim Merabti

► To cite this version:

Karim Merabti. Yellow Fluorescent Protein : étude du π stacking : élaboration d'un modèle du déclin de fluorescence. Chimie théorique et/ou physique. Université Paris Saclay (COMUE); Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen, Algérie), 2015. Français. NNT : 2015SACLS264 . tel-01325225v2

HAL Id: tel-01325225

<https://theses.hal.science/tel-01325225v2>

Submitted on 8 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD
ET L'UNIVERSITÉ DE TLEMCEM (ALGÉRIE)

ÉCOLE DOCTORALE N°571
Sciences chimiques : molécules, matériaux, instrumentation et biosystèmes

Spécialité de doctorat : Chimie

Par

Karim Elhadj Merabti

Yellow Fluorescent Protein : étude du π -stacking; élaboration d'un modèle
du déclin de fluorescence

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 17 décembre 2015 :

Composition du Jury :

Mr	Majdi HOCHLAF	Professeur, Université Paris-Est Marne-la-Vallée	Président du jury
Mr	Olivier PARISEL	Directeur de Recherche, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mr	Abdou BOUCEKKINE	Professeur, Université de Rennes 1	Rapporteur
Mr	David LAUVERGNAT	Directeur de Recherche, Université Paris-Sud	Examineur
Mme	Isabelle DEMACHY	Professeur, Université Paris-Sud	Directrice de thèse
Mme	Sihem AZIZI	Maitre Conférences, Université de Tlemcen (Algérie)	Co-directrice de thèse

A la mémoire de
mon cher papa « M'hamed »

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Mr Mehran Mostafavi et Mr Philippe Maître directeurs successifs du laboratoire de chimie physique (LCP), ainsi que Mr Bachir LIANI directeur du laboratoire de Physique Théorique (LPT) de m'avoir accueilli et permis de mener mes recherches dans leur laboratoire.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger et d'évaluer ces travaux de thèse. Je remercie Mr Abdou Boucekkine et Mr Olivier Parisel, pour leur participation au jury en tant que rapporteurs, je suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux de recherche. Je remercie également Mr David Lauvergnat et Mr Majdi Hochlaf d'avoir participé au jury en tant qu'examinateurs de ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à mes directrices de thèse, Mme Isabelle Demachy et Mme Sihem Azizi pour la confiance qu'elles m'ont accordée durant toutes ces années de thèse, aussi de m'avoir donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche scientifique. Les deux ont fait beaucoup plus que leur devoir et c'est pourquoi je tenais à leur exprimer ma profonde gratitude.

Mes plus profonds remerciements vont à Mr Bernard Lèvy et Mme Jacqueline Ridard pour leur qualité d'encadrement tout au long de ce travail, dont les idées, les conseils, les critiques, mais aussi les encouragements, m'ont été d'une aide précieuse. Sans eux je n'aurais pas pu accomplir ce travail.

Je remercie tous les membres du LCP particulièrement les membres du groupe Theosim pour le climat sympathique dans lequel j'ai pu travailler, pour leur gentillesse, leur compétence et leur humour. Je voudrais remercier mes camarades thésards du LCP, LPT et d'ailleurs : Abdelhamid, Djamel, Estelle, Jérémy, Houda, Mohamed, Sara et Sébastien, qui m'ont accompagné pendant ces années. Merci à eux pour leur gentillesse et pour les discussions partagées.

Un grand merci à tous mes amis de Saida qui m'ont encouragé de près ou de loin.

Je remercie mon grand frère Tayeb et sa femme Adila, qui ont toujours su trouver les mots justes pour me remonter le moral et aussi pour me motiver. Que Dieu vous bénisse et vous protège ainsi que vos enfants "Imran et Adim".

Je remercie mon frère Ahmed, qui a toujours su être à mes côtés malgré la distance qui nous a séparés.

Je remercie ma mère Faridja, sa présence et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

Je rends hommage à mon papa Mhamed qui est parti trop tôt, un homme qui fait ma fierté, j'espère qu'il sera fier de ce que je suis devenu. Que Dieu bénisse son âme.

Je remercie dieu le tout puissant qui m'a donné le courage de continuer et surtout pour toutes ces personnes qu'il a mises sur mon chemin.

Table des matières

Introduction générale	13
1 Propriétés de fluorescence. Le cas de la Yellow Fluorescent Protein	17
1.1 La fluorescence	17
1.2 Les processus non radiatifs	17
1.3 Les protéines fluorescentes	19
1.4 Désactivation non radiative dans les protéines fluorescentes	21
2 Méthodes de Calcul "généralités"	23
2.1 L'équation de Schrödinger	23
2.2 L'approximation de Born-Oppenheimer	24
2.3 Méthode de Hartree-Fock	25
2.3.1 Déterminant de Slater	25
2.3.2 Les équations de Hartree-Fock	26
2.3.3 Les équations de Roothaan-Hall	26
2.4 Méthodes post Hartree-Fock	27
2.4.1 Interaction de configuration	28
2.4.2 Champ multi-configurationnel auto-cohérent (MCSCF)	29
2.4.3 Théorie de perturbation de Rayleigh-Schrödinger	30
2.5 Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)	32
2.5.1 Théorèmes de Hohenberg-Kohn	32
2.6 Erreur de superposition de base	34
3 État excité du chromophore	35
3.1 Choix de la méthode de calcul	35
3.2 Analyse des simulations de dynamique moléculaire de la YFP	39
3.2.1 Translations	40
3.2.2 Rotations	43
3.2.3 Dimension de la grille de points	45
3.3 Energie de transition du système chromophore-phénol	45

4	Énergie d'interaction	49
4.1	L'énergie d'interaction CASPT2	49
4.1.1	Interaction entre le chromophore à l'état fondamental et un phénol . .	50
4.1.2	Interaction entre le chromophore dans l'état S1 et un phénol	53
4.1.3	Les géométries d'équilibre chromophore + phénol	56
4.2	L'énergie d'interaction décrite par un champ de force	57
4.2.1	Caractéristique des champs de force utilisés	57
4.2.2	Énergie d'interaction - Résultats.	58
4.3	Comparaison de CASPT2 avec le potentiel d'un champ de force	66
4.4	Interpolation	68
5	Méthode directe de simulation du déclin de fluorescence	73
5.1	Méthode	74
5.2	Probabilité de conversion non radiative	75
5.3	Probabilité de conversion radiative	76
5.3.1	Expression théorique	76
5.3.2	Zone de conversion radiative	79
5.4	Résultats	81
	Conclusion générale	85
	Bibliographie	93

Table des figures

1	(à gauche) La structure de la GFP, (à droite) le chromophore.	14
2	Le chromophore dans sa forme (a) neutre , (b) anionique	15
3	Chromophore de la YFP en π stacking avec une tyrosine.	16
1.1	Diagramme de Jablonski.	18
1.2	Schéma du mécanisme de formation du chromophore de la famille GFP, proposé par Cubitt et al. [1].	19
1.3	Les acides aminés	20
1.4	Schéma du modèle du chromophore anionique de la GFP - p-hydroxybenzylidene-imidazolinone (HBI) - dans sa forme isomère cis, dans trois géométries différentes ; la géométrie plane (FS : fluorescent state) ($\tau = \varphi = 0^\circ$), la géométrie TwP ($\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ$) et la géométrie TwI ($\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ$).	21
3.1	A gauche : le chromophore anionique de la GFP avec les noms des trois atomes centraux affichés. A droite : trois structures mésomères d'un ion allylique. L'analogie avec le chromophore peut être faite si les deux carbones terminaux sont remplacés par les deux cycles du chromophore.	37
3.2	Espace CAS	37
3.3	Diagramme des énergies d'excitation. a : Nielsen <i>et al.</i> [2].	39
3.4	Les systèmes d'axes (U_c, V_c, W_c) du chromophore et (U_t, V_t, W_t) de la tyrosine.	40
3.5	Système d'axes XYZ	41
3.6	Histogramme des translations suivant X	41
3.7	Histogramme des translations suivant Y	42
3.8	Histogramme des translations suivant Z	42
3.9	Les axes du tangage et du roulis	43
3.10	Histogramme de l'angle de tangage (a) et de l'angle de roulis (b).	44
3.11	Les points de la grille suivant X et Y.	45
3.12	Energie de transition exprimée en longueur d'onde pour différentes distances de Z	46
3.13	Le chromophore dans sa forme anionique, (a) : terminaison avec deux hydrogènes, (b) : terminaison avec deux groupes méthyle	47
4.1	Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$	50

4.2	Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$	51
4.3	Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$	51
4.4	Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$	52
4.5	Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$	52
4.6	Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$	53
4.7	Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$	54
4.8	Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$	54
4.9	Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$	55
4.10	Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$	55
4.11	Géométrie d'équilibre d'énergie minimale	56
4.12	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que l'énergie d'interaction la plus attractive ($-5 \leq \Delta E \text{ (kcal/mol)} \leq -1$) est située dans la région où $-4 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$. Alors que la région répulsive est décalée vers y négatif. Le minimum se trouve dans la géométrie où $x = -2.0 \text{ \AA}$ et $y = 2.0 \text{ \AA}$ où l'énergie est de l'ordre de -4.73 kcal/mol	58
4.13	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$	59
4.14	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$	59
4.15	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$	60
4.16	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$	60
4.17	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$	61
4.18	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$	61
4.19	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$	62
4.20	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$	62
4.21	La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$	63
4.22	Géométrie d'équilibre pour le système chromophore à l'état fondamental + phénol obtenue avec le champ de force.	64
4.23	La variation de l'énergie d'interaction en fonction de y pour différentes distances Z : 3.3 \AA , 3.5 \AA , 3.8 \AA , 4.5 \AA et 5.5 \AA . Avec : (a) $x = +2 \text{ \AA}$, (b) $x = 0 \text{ \AA}$, (c) $x = -2 \text{ \AA}$. Les valeurs obtenues par CASPT2 sont en traits pleins, et celles obtenues par le champ de force sont en pointillés.	66

4.24	La variation de l'énergie d'interaction en fonction de x pour des défirante distance Z : 3.3 Å, 3.5 Å, 3.8 Å, 4.5 Å et 5.5 Å. Avec : (a) $y = +2$ Å, (b) $y = 0$ Å, (c) $y = -2$ Å. Les valeurs obtenues par CASPT2 sont en traits pleins, et celles obtenues par le champ de force sont en pointillés.	67
5.1	La définition des angles de torsion τ et φ	73
5.2	Variation des angles φ (en noir) et τ (en rouge) exprimés en degrés au cours d'une des simulations de la YFP avec le chromophore à l'état S_1	74
5.3	Coupes des surfaces d'énergies potentielle adiabatiques et quasi-adiabatiques du chromophore : à gauche coupe suivant φ à τ constant ($=0$) et à droite, coupe suivant τ à φ constant ($=0$). - lignes pleines rouges et bleu : énergies adiabatiques ; - tirets bleu : énergies quasi-adiabatiques et module de la différence de ces énergies ; - ligne pleine verte : élément de matrice non diagonal de l'hamiltonien effectif entre les deux états quasi-adiabatiques.	76
5.4	Valeurs des probabilités de fluorescence déduite des calculs CASPT2[3] à l'aide de l'eq.(5.8) à gauche : valeurs de P obtenues pour les géométries où un calcul CASPT2 a été fait et ellipses délimitant les zones où P prend différents ordres de grandeurs ; à droite : code couleur des ellipses et des points du cadre de gauche.	80
5.5	Types de graphes attendus pour p_r et p_{nr} et résultant de l'hypothèse 1	81
5.6	Corrélation entre les angles τ et φ au cours des simulations à l'état S_1 de la GFP et de la YFP. L'ellipse rouge entoure la zone de conversion radiative, les cercles verts entourent les zones de conversion non radiative.	82
5.7	Valeurs de t_r et de t_{nr} obtenus par simulation dans la GFP (47 simulations de 6 ns chacune) et dans la YFP (20 simulation de 4 ns chacune)	82

Introduction générale

Le cadre général de cette thèse est une étude théorique par chimie quantique et dynamique moléculaire visant à interpréter la relation entre la structure et la fluorescence des protéines fluorescentes, en particulier, la façon dont le temps de vie de fluorescence dépend du milieu. Elle se situe dans le cadre de l'axe transversal Simbiose du Laboratoire de Chimie Physique (LCP) de l'université Paris-Sud réunissant des théoriciens du groupe Theosim et des expérimentateurs du groupe de Biologie Physico-chimique. Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une cotutelle pendant trois ans entre l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen en Algérie et l'Université Paris-Sud en France.

Il ya plus de 50 ans, la protéine fluorescente verte (GFP) était découverte dans la méduse *Aequorea Victoria* [4], elle a commencé à recueillir beaucoup d'attention après son clonage en 1992 [5] et la première démonstration de son utilité comme un marqueur fluorescent pour l'étiquetage *in vivo* a été faite en 1994 [6]. Elle est caractérisée par son spectre d'émission dans le visible, de couleur verte (longueur d'onde approximativement de 508 nm).[7] Un grand nombre de protéines de la famille de la GFP ont été découvertes dans d'autres organismes marins (FPs sauvages) *e.g.* les méduses, les coraux et les anémones de mer. Certaines ont été conçues par mutations dans les laboratoires par des biologistes pour décaler leurs spectres de fluorescence vers les extrémités bleues et rouges du spectre visible (FPs mutants) [8, 9, 10].

La GFP est devenue un outil unique qui permet la visualisation directe des structures et des processus dans les cellules vivantes. Par la suite, un vif intérêt est apparu dans la structure, la biochimie et la biophysique des protéines fluorescentes, ce qui a donné beaucoup de publications scientifiques sur les protéines fluorescentes et leurs applications en biologie moléculaire et cellulaire.

Leur rôle biologique n'est pas encore bien déterminé. Elles peuvent être impliquées dans la photosynthèse [11], la photoréception [12], ou une protection contre la lumière du soleil [11] pour l'organisme porteur. En revanche, elles peuvent être utilisées dans une grande variété d'études et leurs applications sont en expansion continue. Elles sont utilisées au laboratoire comme sondes chimiques capables de mesurer la température, le pH local ou la distance entre protéines. Elles sont également l'un des supports possibles de l'ultramicroscopie [13]. Une des applications les plus populaires de la famille de la GFP est le marquage des protéines [14] pour les visualiser dans les systèmes vivants en temps réel.

La mesure de l'efficacité du transfert d'énergie entre deux protéines de la famille GFP est

actuellement l'une des approches les plus couramment utilisées pour surveiller les interactions protéine-protéine dans les cellules vivantes [15]. Cette approche est basée sur le fait que le chromophore excité d'une protéine, le donneur, peut transférer son énergie d'émission à un chromophore accepteur dont l'énergie d'absorption est égale à l'énergie d'émission du donneur, à travers un mécanisme appelé FRET « Förster Resonance Energy Transfer » [16]. Pour ce type d'expérience, la paire donneur/accepteur la plus utilisée est la CFP (cyan fluorescent protein, le donneur) et la YFP (yellow fluorescent protein, l'accepteur). Cette dernière fait l'objet de notre étude.

Les protéines de la famille GFP ont toutes la même structure globale (figure 1) : un tonneau formé de 11 feuillets β et d'une hélice α dont fait partie le chromophore (le groupement responsable de la fluorescence).

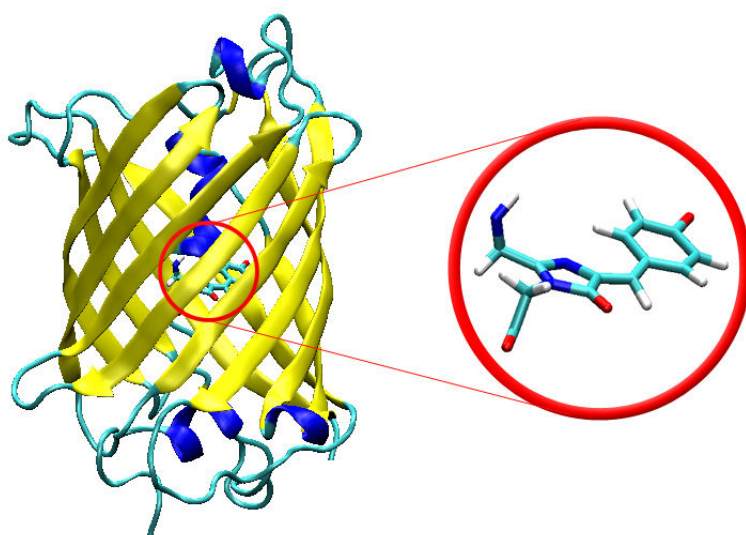


FIGURE 1: (à gauche) La structure de la GFP, (à droite) le chromophore.

Le chromophore est entouré par un grand nombre d'acides aminés et de molécules d'eau qui sont capables de jouer un rôle dans la maturation du chromophore [17, 18], ou d'influencer l'absorption [19]. Il existe deux états possibles de protonation du chromophore dans les protéines de la famille GFP : une forme neutre (figure 2a) et une forme anionique (figure 2b) ou « déprotonée » obtenue par le départ du proton du groupement hydroxyl du cycle phénol. [20, 21]. Le chromophore est formé de deux cycles, un cycle phénol (ou phénolate) et un cycle imidazolinone, reliés par un pont.

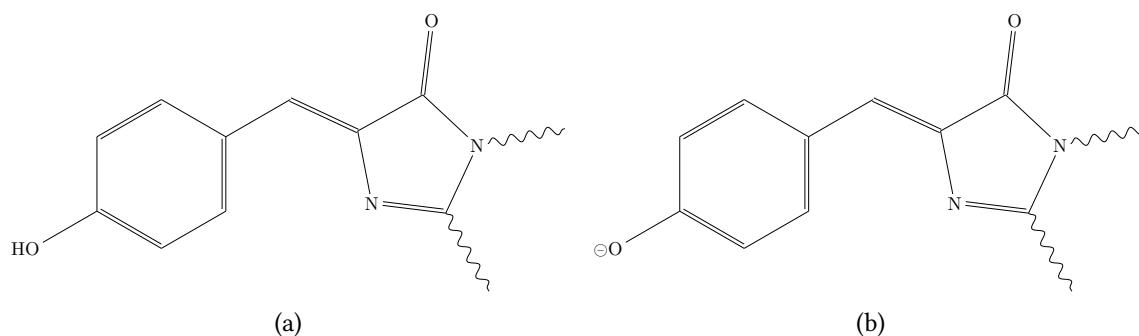


FIGURE 2: Le chromophore dans sa forme (a) neutre , (b) anionique

Le chromophore à l'état excité S_1 est fluorescent seulement dans des géométries proches de la géométrie plane. La fluorescence est en compétition avec une désactivation non radiative par conversion interne quand le chromophore est dans des géométries perpendiculaires (géométries où les cycles phénol et imidazolinone sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre). Le chromophore isolé ou en solution à température ambiante n'est pratiquement pas fluorescent parce que lorsqu'il est dans l'état S_1 il subit une rotation interne vers une géométrie perpendiculaire, en un temps de l'ordre de la picoseconde[22]. Mais si il est dans une solution à très basse température, le mouvement de rotation est gêné et il peut fluorescer. Lorsqu'il est dans une protéine, les acides aminés autour de lui peuvent aussi l'empêcher de tourner, il reste alors dans sa géométrie plane, et il peut fluorescer.

Les propriétés photophysiques très variées des protéines fluorescentes dépendent fortement de la proportion des deux états de protonation du chromophore, et de la façon dont les acides aminés proches du chromophore l'empêchent de tourner vers les géométries perpendiculaires [22].

L'étude théorique des protéines fluorescentes permet de comprendre la dynamique dans les milieux protéiques et ainsi d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques en combinant des méthodes de dynamique moléculaire et de chimie quantique. De nombreuses études théoriques ont été menées sur les protéines de la famille GFP ces dernières années, citons, celle faite dans notre groupe, qui a permis d'étudier l'extinction de fluorescence dans la GFP et la YFP [3, 23]. Ils ont réalisé cette étude à l'aide de simulations de dynamique moléculaire à l'état excité du chromophore avec un champ de forces classique où ils ont développé un nouveau potentiel pour le chromophore anionique (NADIA). Pour la GFP, ils ont obtenu un temps moyen pour atteindre les géométries perpendiculaires où la désactivation non radiative peut avoir lieu en bon accord avec les résultats expérimentaux[3].

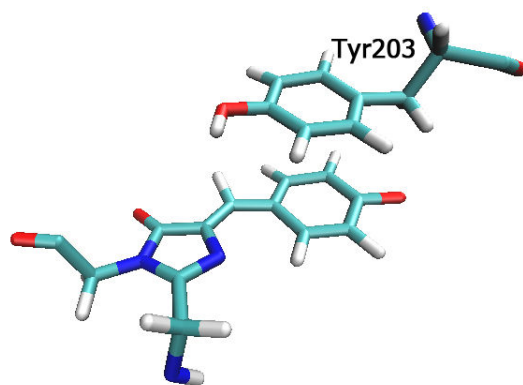


FIGURE 3: Chromophore de la YFP en π stacking avec une tyrosine.

Dans le cas de la YFP, ce temps moyen est environ trois fois plus petit que la valeur qu'on peut déduire des résultats expérimentaux[23]. Dans la protéine fluorescente jaune (YFP)[24] la thréonine 203 est remplacée par une tyrosine. Avec cette dernière (tyrosine), un phénomène de π stacking avec le phenolate du chromophore (figure 3) est observé. Ce phénomène a pour effet de réduire l'énergie de transition électronique et de décaler de + 20 nm les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission [25]). On peut aussi s'attendre à qu'il gêne les mouvements de torsion du chromophore vers les géométries perpendiculaires. Donc une cause possible du temps calculé trop court pourrait être une mauvaise représentation du π -stacking entre le chromophore et la tyrosine 203. L'étude de cette interaction constitue la première partie de cette thèse. Dans la deuxième partie, nous proposons un modèle original d'analyse du déclin de la population de l'état excité à partir des résultats de dynamique moléculaire. Ce modèle tient compte entre autres du fait que les désexcitations radiative et non radiative ont lieu dans des zones de géométries totalement différentes (modèle de déclin par zones).

Ce manuscrit est composé de 5 chapitres. Dans le premier chapitre, les principes généraux des phénomènes photophysiques sont rappelés brièvement, puis nous présentons les caractéristiques de la protéine fluorescente jaune (YFP). Dans le deuxième chapitre, nous présentons les fondements théoriques des calculs de chimie quantique qui sont utilisés pour résoudre l'équation de Schrödinger pour les électrons dans les molécules. Ensuite, dans le troisième chapitre nous précisons les caractéristiques des calculs quantiques CASPT2 permettant la description du premier état excité du chromophore. Puis on définit l'ensemble des positions relatives du chromophore et d'un cycle phénol à étudier au niveau CASPT2 pour représenter la variation de l'interaction π -stacking. Dans le quatrième chapitre, on analyse les énergies d'interaction chromophore-phénol obtenue sur une large grille de positions relatives par un calcul CASPT2 ou en utilisant un champ de force classique. Puis nous présentons les premiers résultats de construction d'un champ de force par interpolation des calculs quantiques pour le système chromophore excité – phénol. Enfin, dans le cinquième chapitre, nous présentons le modèle d'analyse du déclin de la population du chromophore excité et les résultats obtenus pour la GFP et la YFP.

Chapitre 1

Propriétés de fluorescence. Le cas de la Yellow Fluorescent Protein

Dans ce chapitre, les principes généraux des phénomènes photophysiques sont rappelés, puis les caractéristiques de la protéine utilisée sont présentées. Enfin une analyse des états excités du chromophore de la YFP est fournie afin de connaître les mécanismes entre le chromophore et la tyrosine à l'état excité.

1.1 La fluorescence

Lorsqu'une molécule à l'état électronique fondamental (en général un état singulet S_0) absorbe un photon de longueur d'onde suffisamment énergétique (dans la bande d'adsorption de la molécule), il se produit un apport d'énergie $E = hc/\lambda$ (où h : constante de Planck, c : célérité de la lumière et λ : longueur d'onde absorbée) qui amène la molécule dans un état électronique singulet excité (S_1 , S_2 ...) en restant dans la géométrie de l'état fondamental (transition verticale). Il y a ensuite une évolution de la géométrie vers la géométrie d'équilibre la plus proche de l'état excité, puis la molécule peut retourner à l'état S_0 en émettant un photon ayant moins d'énergie que le photon absorbé. L'intervalle de temps moyen qui sépare l'absorption et la restitution d'énergie est appelé «durée de vie» de l'état excité. Il s'agit de temps très court (de l'ordre de quelques femtosecondes à nanosecondes).

Mais il y a en général d'autres chemins de retour à l'état fondamental où la molécule n'émet pas de photon. On les appelle les désexcitations non radiatives.

1.2 Les processus non radiatifs

La molécule excitée dans un état singulet peut être le siège d'une série de réactions dont les manifestations sont diverses, jusqu'à son retour à l'état stable, comme cela est montré sur le diagramme de Jablonski (figure 1.1). La dissipation d'énergie s'effectue selon 2 types de processus différents :

- Processus radiatif : fluorescence .
- Processus non radiatifs : conversion interne (CI) ou relaxation vibrationnelle(RV).

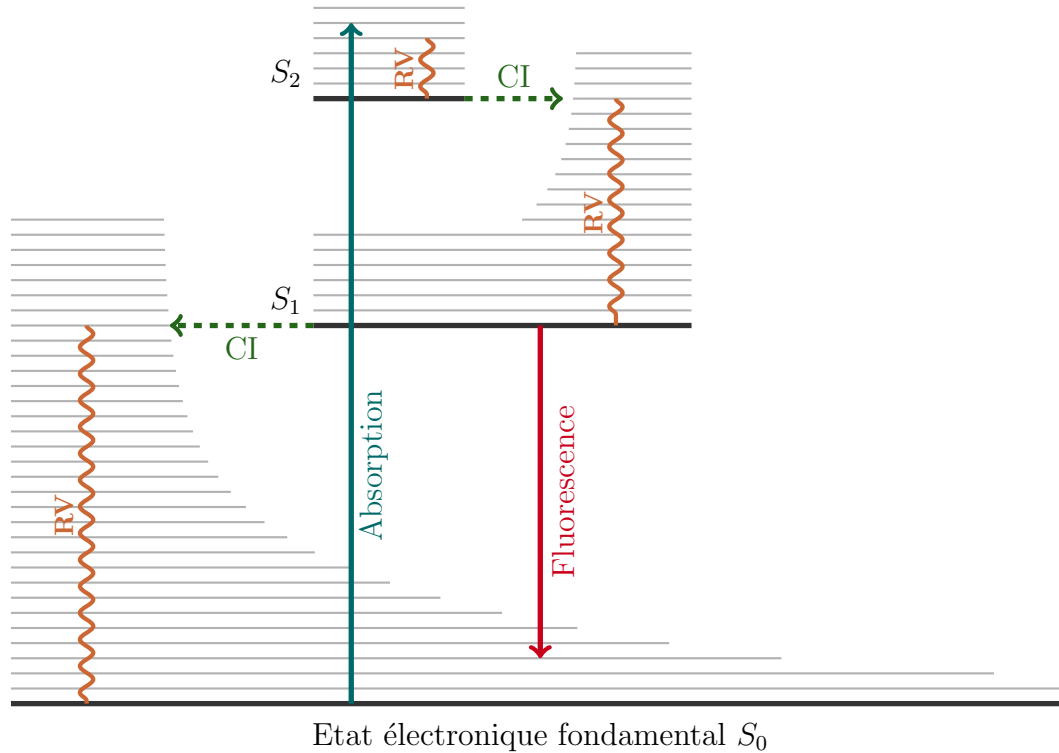


FIGURE 1.1: Diagramme de Jablonski.

L'intensité de la fluorescence correspond au nombre de photons émis par unité de temps dans des conditions d'excitation données. Ce nombre est proportionnel au nombre d'atomes ou de molécules présents dans le milieu et donc à la concentration. Ceci permet une analyse quantitative. Le rendement quantique ϕ correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de molécules excitées, c'est aussi la probabilité pour que le chromophore excité émette un photon. La durée de vie de fluorescence, τ , ou temps de déclin de fluorescence correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité, temps moyen pendant lequel une molécule fluorescente demeure excitée.

Soient k_r et k_{nr} les constantes de vitesse de la désexcitation radiative et de la désexcitation non radiative. Elles sont reliées au temps de vie de fluorescence τ et au rendement quantique ϕ [26] :

$$\tau = 1/(k_r + k_{nr}) \quad (1.1)$$

$$\phi = k_r/(k_r + k_{nr}) \quad (1.2)$$

1.3 Les protéines fluorescentes

La protéine fluorescente verte de la méduse *Aequorea Victoria* et ses différentes variantes ont été largement utilisées en tant que marqueur en biologie moléculaire. Diverses applications dans les études physiologiques de cellules vivantes ont été décrites [1, 27, 28, 8]. La structure cristallographique de la GFP « sauvage » (celle de la méduse *Aequorea Victoria*) a été déterminée en 1997 [20]. La protéine est formée d'un tonneau de 11 feuillets β contenant une hélice centrale qui porte le chromophore. Le chromophore est formé spontanément après le repliement de la protéine par cyclisation de 3 acides aminés : une sérine, une tyrosine et une glycine (Ser65, Tyr66 et Gly67) (voir figure 1.2 et 1.3), conduisant à la formation d'un noyau hétérocyclique de type imidazolinone, suivie par l'oxydation de Tyr66 en présence d'oxygène moléculaire [29]. Le chromophore comporte donc deux cycles, un cycle imidazolinone, et un cycle phénol (ou phénolate), relié par un groupement CH. Le chromophore peut être neutre ou anionique (voir figure 2) dans le cas où le phénol a perdu l'hydrogène de son groupement hydroxyl et est devenu un phénolate. Dans la GFP sauvage il existe à la fois la forme neutre (majoritaire) qui absorbe dans l'ultra violet proche et la forme anionique qui absorbe dans le visible [8]. Quand on excite le chromophore dans la bande d'absorption de l'anion on voit une émission de fluorescence verte à 504 nm. Quand on excite dans la bande d'absorption du neutre on voit majoritairement une fluorescence verte car le chromophore neutre excité perd très rapidement le proton du phénol et devient anionique.

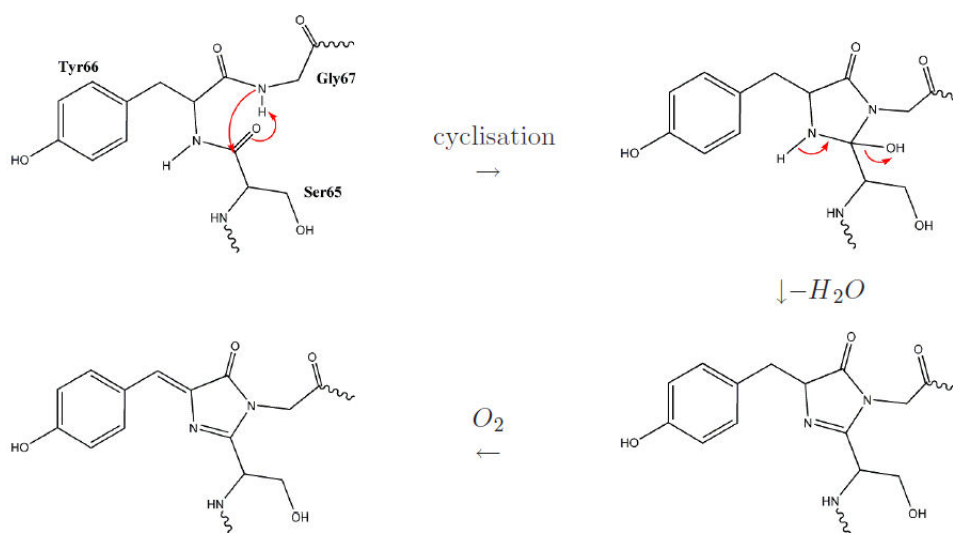


FIGURE 1.2: Schéma du mécanisme de formation du chromophore de la famille GFP, proposé par Cubitt et al. [1].

Un grand nombre de mutants de la GFP "sauvage" ont été générés en laboratoire et d'autres ont été découverts dans d'autres organismes marins [30, 31, 32]. Ces variants émettent des

rayonnements de fluorescence qui couvrent tout le spectre visible. Le transfert résonant d'énergie de fluorescence (FRET) a été utilisé pour étudier les interactions protéine-protéine *in vivo* [33, 34, 35, 36]. Dans ce type d'expérience, deux protéines fluorescentes de couleurs différentes sont choisies de façon que le spectre d'émission de l'une (le donneur) ait un recouvrement avec le spectre d'absorption de l'autre (l'accepteur). La protéine fluorescente jaune (YFP) est d'un intérêt particulier, car son spectre est déplacé suffisamment pour le rendre facilement reconnaissable à partir du spectre de la protéine fluorescente cyan (CFP) dans les mesures de FRET [8, 35].

La YFP diffère de la GFP sauvage par 4 mutations. L'une concerne le chromophore : la sérine 65 est remplacée par une glycine (mutation S65G). Les autres portent sur des acides aminés proches du chromophore : la thréonine 203 est remplacée par une tyrosine (T203Y), la valine 68 par une leucine (V68L) et la sérine 72 par une alanine (S72A).

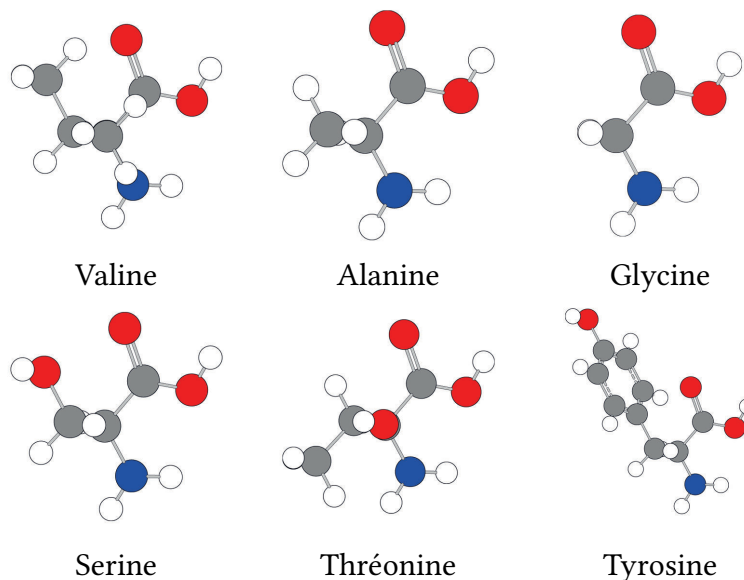


FIGURE 1.3: Les acides aminés

Comme dans le cas de la GFP sauvage, il y a deux bandes dans le spectre d'absorption de la YFP à pH neutre, l'une à 392 nm correspond au chromophore neutre, l'autre à 514 nm correspond au chromophore anionique [25]. Quand on excite le chromophore dans la bande d'absorption de l'anion, il émet un rayonnement de fluorescence à 528 nm, décalé de 24 nm (0.1 eV) vers le jaune par rapport celui de la GFP sauvage. La structure cristallographique [25] montre que la tyrosine 203 est en situation de π -stacking avec le phénolate du chromophore. C'est cette interaction qui est la cause du déplacement de la fluorescence vers le jaune.

1.4 Désactivation non radiative dans les protéines fluorescentes

Le chromophore anionique excité émet de la lumière verte seulement si il est dans une géométrie à peu près plane. Mais la géométrie la plus stable dans l'état S_1 n'est pas la géométrie plane. De nombreux auteurs [37, 38, 39, 3, 40] ont montré par des calculs de chimie quantique que, dans le cas de la forme anionique, les deux géométries définies par ($\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ$) et ($\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ$) (figure 1.4) ont une énergie plus basse que la géométrie plane, et que les barrières pour passer de la géométrie plane à ces géométries sont très basses. Dans ces géométries où le cycle Phénolate et Imidazolinone sont perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, l'écart énergétique entre S_1 et S_0 est petit ($\sim 0.5\text{eV}$) et une conversion interne peut ramener le système de l'état électronique S_1 à l'état S_0 par un couplage des niveaux vibrationnels. La fluorescence est éteinte dans les géométries perpendiculaires. A l'inverse la conversion interne n'est pas probable dans la géométrie plane car la différence d'énergie est grande ($\sim 3\text{ eV}$).

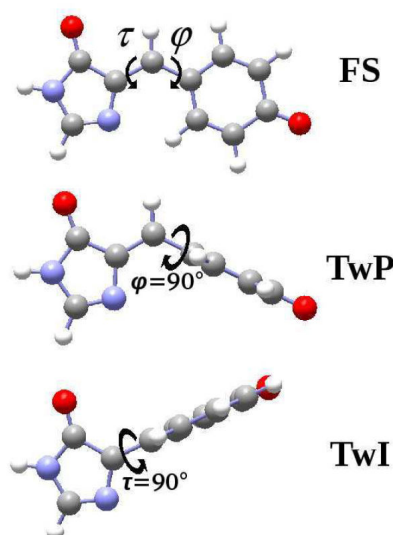


FIGURE 1.4: Schéma du modèle du chromophore anionique de la GFP - p-hydroxybenzylidene-imidazolinone (HBI) - dans sa forme isomère cis, dans trois géométries différentes ; la géométrie plane (FS : fluorescent state) ($\tau = \varphi = 0^\circ$), la géométrie TwP ($\tau = 0^\circ, \varphi = \pm 90^\circ$) et la géométrie TwI ($\tau = \pm 90^\circ, \varphi = 0^\circ$).

Donc la durée de vie du chromophore à l'état excité S_1 dépend de deux processus : la désactivation radiative quand il est dans la géométrie plane et la désactivation non radiative quand il est dans une géométrie perpendiculaire.

Le chromophore isolé ou en solution à température ambiante n'est pratiquement pas fluorescent parce que les rotations vers une géométrie perpendiculaire sont très peu ou pas du tout gênées. Mais si il est en solution à très basse température, le mouvement de rotation est gêné

et il peut fluorescer. Lorsqu'il est dans une protéine, les acides aminés autour de lui peuvent aussi l'empêcher de tourner, il reste alors dans sa géométrie plane, et il peut fluorescer.

Des calculs de dynamique moléculaire ont été effectués dans notre groupe, pour simuler la torsion du chromophore à l'état excité dans le cas du mutant S65T de la GFP et dans le cas de la YFP. Les résultats sont exposés dans la thèse de Gabriella Jonasson [23] et dans la référence [3]. Ils ont abouti à une évaluation du temps moyen pour obtenir cette torsion, noté τ_{nr} qu'on peut interpréter comme l'inverse de la constante de vitesse k_{nr} .

En utilisant les relations 1.2 1.1, on voit que :

$$\tau_{nr} = \tau / (1 - \phi) \quad (1.3)$$

Si l'on connaît les valeurs expérimentales de ϕ et τ , on peut donc en déduire une valeur de τ_{nr} et la comparer à la valeur obtenue par simulations.

Dans le cas de la protéine GFP/S65T la valeur expérimentale est $\tau_{nr}(\text{exp}) = 8.3 \text{ ns}$ et la valeur obtenue par simulation est $8.6 \text{ ns} \pm 2.6 \text{ ns}$ donc en très bon accord.

Dans le cas de la YFP, les valeurs expérimentales sont $\tau = 3.68 \text{ ns}$ [41] et $\phi = 0.61$ [8]. La valeur expérimentale de τ_{nr} est donc 9.4 ns , et la valeur simulée est $(3.5 \pm 0.2) \text{ ns}$. On a donc un temps trop court, c'est à dire que les torsions vers les états perpendiculaires sont trop rapides.

Il peut y avoir plusieurs explications. On peut penser que le champ de force habituel utilisé dans la dynamique moléculaire (AMBER) ne décrit pas bien le π -stacking entre le phénolate du chromophore à l'état excité et le cycle phénol de la tyrosine voisine. De cette hypothèse vient la motivation de notre étude. Dans l'expression analytique du champ de force AMBER, il y a des termes de l'énergie d'interaction entre atomes liés et l'énergie d'interaction entre atomes non liés (interaction électrostatique et interaction de van der Waals). Or, les paramètres de van der Waals dépendent de la polarisabilité des systèmes en interaction. On s'attend donc à ce qu'il soient significativement différents dans un état fondamental et dans un état excité parce que la polarisabilité est d'habitude plus grande dans les états excités. L'idée est de modifier les termes des interactions non liées ou bien d'ajouter un ou plusieurs termes supplémentaires à cette expression en les ajustant sur les énergies d'interaction *ab initio* calculées par méthode de chimie quantique. Par ailleurs, la façon dont on évalue τ_{nr} à partir des simulations peut être améliorée. Nous avons pour cela utilisé un nouveau modèle de description du déclin de fluorescence élaboré par Bernard Lévy.

Chapitre 2

Méthodes de Calcul "généralités"

Un des principaux objectifs de la chimie quantique est de résoudre l'équation de Schrödinger indépendante du temps et de déterminer la structure électronique des atomes et des molécules. Dans ce chapitre, nous présentons les fondements théoriques des calculs de chimie quantique qui sont utilisés pour résoudre l'équation de Schrödinger pour les électrons dans les molécules : nous établissons les équations qui sont utilisées et décrivons certaines des approximations qui rendent les calculs réalisables.

2.1 L'équation de Schrödinger

La chimie quantique est basée sur la résolution de l'équation de Schrödinger [42] afin de déterminer l'énergie et la fonction d'onde d'une molécule. L'équation de Schrödinger indépendante du temps (2.1) est donné par :

$$\hat{H} |\Psi\rangle = E |\Psi\rangle \quad (2.1)$$

Où, E est l'énergie totale du système, elle peut être obtenue par l'opération du hamiltonien \hat{H} sur la fonction d'onde $|\Psi\rangle$. L'hamiltonien est donné par :

$$\hat{H} = \hat{T} + \hat{V} \quad (2.2)$$

où \hat{T} et \hat{V} sont respectivement les opérateurs des énergies cinétique et potentielle, ils s'écrivent :

$$\left\{ \begin{array}{l} \hat{T} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_i^N \frac{1}{m_i} \nabla_i^2 \\ \hat{V} = \sum_i^N \sum_j^N \left(\frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \end{array} \right. \quad (2.3)$$

où m_i est la masse de la particule i , q_i et q_j sont les charges des particules i et j respectivement et r_{ij} est la distance entre i et j .

L'équation de Schrödinger indépendante du temps (2.1), ne peut être résolue exactement

pour une molécule à plusieurs électrons. Pour contourner cette difficulté, on introduit des approximations.

2.2 L'approximation de Born-Oppenheimer

Dans l'équation (2.2), les termes nucléaires sont séparés des termes électroniques, en la développant, \hat{H} devient :

$$\begin{aligned} \hat{H} = & - \underbrace{\sum_a \frac{\hbar}{2m_e} \nabla_a^2}_{\hat{T}_{el}} - \underbrace{\sum_A \frac{\hbar}{2m_A} \nabla_A^2}_{\hat{T}_{nu}} - \underbrace{\sum_a \sum_A \frac{Z_A e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{aA}}}_{\hat{U}_{en}} \\ & + \underbrace{\sum_a \sum_{b>a} \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{ab}}}_{\hat{U}_{ee}} + \underbrace{\sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_i Z_j e^2}{4\pi\epsilon_0 R_{AB}}}_{\hat{U}_{nn}} \end{aligned} \quad (2.4)$$

Où ∇^2 est le laplacien, m_e et m_A sont la masse de l'électron et du noyau respectivement. Ils sont utilisés pour définir les deux termes de l'énergie cinétique \hat{T}_{el} et \hat{T}_{nu} . Le troisième terme \hat{U}_{en} représente l'attraction coulombienne entre l'électron et le noyau. Les deux termes \hat{U}_{ee} et \hat{U}_{nn} représentent la répulsion entre deux électrons et deux noyaux, respectivement.

L'approximation de Born-Oppenheimer [43] prend en compte la différence de masse entre les électrons et le noyau. Pour bien illustrer cette différence, prenons le cas de l'atome d'hydrogène, le rapport de masse du noyau avec l'électron est de 1836. En raison de cette différence de masse, les noyaux sont considérés comme fixes. En conséquence, l'hamiltonien électronique est donné par :

$$\hat{H}_{ele} = - \sum_a \frac{\hbar}{2m_e} \nabla_a^2 - \sum_a \sum_A \frac{Z_A e^2}{4\pi\epsilon_0 r_{aA}} + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(\sum_a \sum_{b>a} \frac{e^2}{r_{ab}} \right) \quad (2.5)$$

Le terme d'énergie cinétique pour les noyaux ainsi que la répulsion entre les noyaux, sont des constantes. L'équation de Schrödinger électronique devient alors :

$$\hat{H}_{ele} \left| \Psi_{ele}(r_a; R_A) \right\rangle = E_{ele}(R_A) \left| \Psi_{ele}(r_a; R_A) \right\rangle \quad (2.6)$$

où la fonction d'onde électronique, $\Psi_{ele}(r_a; R_A)$, dépend directement des coordonnées d'électrons r_a , et de façon paramétrique des coordonnées nucléaires R_A , tout comme les énergies électroniques, $E_{ele}(R_A)$. L'énergie potentielle pour un état électronique donné est défini comme une somme de l'énergie électronique $E_{ele}(R_A)$ et la répulsion nucléaire $\hat{U}_{nn}(R_A)$, pour une configuration nucléaire spécifique R_A :

$$\hat{V}_{ele} = E_{ele}(R_A) + \hat{U}_{nn}(R_A) \quad (2.7)$$

Résoudre l'équation de Schrödinger électronique (2.6) pour différentes coordonnées nucléaires produit une série d'énergies ponctuelles qui peuvent être connectées pour former des

surfaces d'énergie potentielle. Il est possible de résoudre cette équation pour des systèmes mono-électroniques, mais afin de la résoudre pour des systèmes à plusieurs électrons, il faut introduire d'autres approximations. La plus fondamentale de ces approximations est l'approximation de Hartree-Fock.

2.3 Méthode de Hartree-Fock

La méthode Hartree-Fock (HF) [44, 45] est une approximation qui détermine l'énergie de l'état fondamental et la fonction d'onde d'un système de N -électrons. Elle se rapproche de la fonction d'onde exacte comme un déterminant unique appelé déterminant de Slater [46] qui est optimisé par la résolution de l'équation de Hartree-Fock itérative, dans un processus connu sous le nom de la méthode champ auto-cohérent (SCF).

2.3.1 Déterminant de Slater

Le déterminant de Slater est la fonction d'onde qui peut être utilisée pour décrire l'état fondamental d'un système à N -électrons :

$$\Psi_0(X) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(X_1) & \chi_1(X_2) & \cdots & \chi_1(X_N) \\ \chi_2(X_1) & \chi_2(X_2) & \cdots & \chi_2(X_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_N(X_1) & \chi_N(X_2) & \cdots & \chi_N(X_N) \end{vmatrix} \quad (2.8)$$

Le déterminant est décrit par des fonctions $\chi_N(X_N)$ connues comme étant des spinorbitales, la notation X_N désignant les coordonnées d'espace et de spin du N -ième électron. Elle est formée à partir du produit d'une orbitale spatiale $\psi(r)$, qui dépend de la position de l'électron, avec une fonction de spin ($\alpha(\omega)$ ou $\beta(\omega)$).

$$\chi_a(X_a) = \chi_a(r, \omega) = \psi(r) \cdot \begin{cases} \alpha(\omega) \\ \beta(\omega) \end{cases} \quad (2.9)$$

Elle est orthonormée :

$$\langle \chi_a | \chi_b \rangle = \delta_{ab} \quad (2.10)$$

Selon le principe variationnel, la fonction d'onde $\Psi_0(X)$ est celle qui donne l'énergie la plus basse :

$$E_0 = \langle \Psi_0(X) | \hat{H}_{ele} | \Psi_0(X) \rangle \quad (2.11)$$

La minimisation de l'énergie amène à résoudre les équations de Hartree-Fock.

2.3.2 Les équations de Hartree-Fock

Les équations de Hartree-Fock sont définies par :

$$\hat{f}(X_a) \left| \chi(X_a) \right\rangle = \varepsilon_0 \left| \chi(X_a) \right\rangle \quad (2.12)$$

C'est une équation aux valeurs propres dont la solution donne l'énergie minimale E_0 , où l'opérateur de Fock est défini comme suit :

$$\hat{f}(X_a) = \underbrace{\frac{\hbar}{2m_e} \nabla_a^2 - \sum_A \frac{Ze^2}{4\pi\epsilon_0 r_{aA}}}_{\hat{h}(X_a)} + \underbrace{\sum_b^N [\hat{J}_b(X_a) - \hat{K}_b(X_a)]}_{\hat{V}^{HF}(X_a)} \quad (2.13)$$

$\hat{h}(X_a)$ est l'opérateur monoélectronique et $\hat{V}^{HF}(X_a)$ est l'opérateur du potentiel de Hartree-Fock.

L'opérateur du potentiel de Hartree-Fock est défini par deux termes :

– \hat{J}_b opérateur coulombien :

$$\hat{J}_b(X_1) \chi_a(X_1) = \chi_a(X_1) \int dX_2 \chi_b^*(X_2) \frac{1}{r_{12}} \chi_b(X_2) \quad (2.14)$$

qui est classiquement décrit comme l'interaction d'un électron a avec les $N-1$ électrons restants, dans ce cas l'électron b .

– \hat{K}_b opérateur d'échange :

$$\hat{K}_b(X_1) \chi_a(X_1) = \chi_b(X_1) \int dX_2 \chi_b^*(X_2) \frac{1}{r_{12}} \chi_a(X_2) \quad (2.15)$$

L'équation (2.12) est nonlinéaire et doit être résolue itérativement. On suppose que les spinorbitales, solutions de cette équation, sont connues et on calcule l'opérateur du potentiel \hat{V}^{HF} qui nous permet d'obtenir de nouvelles spinorbitales.

2.3.3 Les équations de Roothaan-Hall

On peut écrire les équation de Hartree-Fock (2.12) sous la forme :

$$\hat{f}(r_1) \left| \psi_i(r_1) \right\rangle = \varepsilon_i \left| \psi_i(r_1) \right\rangle \quad (2.16)$$

Où la fonction d'onde $\psi_i(r_1)$ est une orbitale moléculaire et ε_i est l'énergie correspondante. Pour un système moléculaire, l'équation ne peut pas être résolue de manière analytique, mais elle est transformée en un ensemble d'équations algébriques en introduisant d'abord un ensemble de fonctions spatiales, tel que présenté par Roothaan et Hall [47, 48]

Le principe des équations de Roothaan-Hall est que les orbitales moléculaires peuvent être développées comme une combinaison linéaire des M fonctions à un électron, ce développement est appelé *méthode de Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques (LCAO)* [49, 50] :

$$|\psi_i\rangle = \sum_{\mu=1}^M C_{\mu i} |\phi_\mu\rangle \quad (2.17)$$

Où les fonctions de base sont notées avec des indices grecs et les orbitales moléculaires avec des indices latins. L'équation (2.17) peut être insérée dans l'équation (2.16) en multipliant par la gauche avec ϕ_v^* et en intégrant on obtient l'équation matricielle suivante :

$$\sum_{\mu}^M C_{\mu i} \underbrace{\int dr_1 \phi_v^*(r_1) \hat{f}(r_1) \phi_\mu(r_1)}_{F_{\mu\nu}} = \varepsilon_i \sum_{\mu}^M C_{\mu i} \underbrace{\int dr_1 \phi_v^*(r_1) \phi_\mu(r_1)}_{S_{\mu\nu}} \quad (2.18)$$

Les éléments de la matrice $S_{\mu\nu}$ décrivent le recouvrement entre deux fonctions μ et ν et forment une matrice de recouvrement S . La matrice de Fock est formée à partir des éléments de la matrice $F_{\mu\nu}$.

L'équation (2.18) peut être écrite sous la forme compacte :

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\varepsilon \quad (2.19)$$

Où la matrice \mathbf{C} contient les coefficients des orbitales moléculaires ψ_i et les énergies de chaque orbitale moléculaire sont présentes dans la matrice ε (diagonale, par convention).

Pour résoudre un système non linéaire, une approche itérative [44] est utilisée, nommée *champ auto-cohérent* (SCF pour *self consistent field*), introduit par Hartree en 1928. Elle a été appliqué aux équations non linéaires de Roothaan-Hall. Cette méthode commence par la résolution des équations non linéaires avec un jeu de coefficients d'orbitales moléculaires, parce que l'opérateur de Fock dépend également de ces coefficients. Un nouvel ensemble de coefficients avec leurs énergies est produit et après chaque itération la matrice de densité obtenue est comparée avec la précédente et si elle ne change pas, la procédure atteint l'auto-cohérence et le processus itératif s'arrête.

2.4 Méthodes post Hartree-Fock

L'approximation Hartree-Fock consiste à remplacer le terme d'interaction inter électronique de l'équation de Schrödinger par une interaction de champ moyen. Cette méthode ignore la corrélation électronique [51]. L'énergie associée à cette corrélation est définie comme la différence d'énergie entre l'énergie exacte (E_{el} obtenue à partir de l'équation (2.6)), dans les limites de l'approximation de Born-Oppenheimer, et l'énergie Hartree-Fock devient :

$$E_{corr} = E_{exact} - E_{HF} \quad (2.20)$$

Il existe deux types de méthodes pour tenir compte de la corrélation électronique :

- Les méthodes variationnelles telles que l'interaction de configuration (CI), l'interaction

de configuration multi référence (MRCI) et la méthode du champ auto cohérent multi-configurationnelle (MCSCF).

- Les méthodes de perturbation telles que la théorie des perturbations multi corps (MBPT) et la méthode de clusters couplés (CC).

2.4.1 Interaction de configuration

La fonction d'onde exacte de l'état fondamental peut être exprimée comme une combinaison linéaire de tous les déterminants de Slater. Par conséquent, nous pouvons écrire la fonction d'onde électronique exacte :

$$\Psi = c_0\psi_0 + \underbrace{\sum_{a,p} c_a^p \psi_a^p}_{\text{mono excitation (M)}} + \underbrace{\sum_{\substack{a<b \\ p<q}} c_{ab}^{pq} \psi_{ab}^{pq}}_{\text{double excitation (D)}} + \underbrace{\sum_{\substack{a<b<c \\ p<q<r}} c_{abc}^{pqr} \psi_{abc}^{pqr}}_{\text{triple excitation (T)}} + \dots \quad (2.21)$$

Où le premier terme représente le déterminant Hartree-Fock et les autres fonctions d'état de configuration (*CSF pour configuration state function*) peuvent être déterminées par le nombre de spinorbitales échangées avec les orbitales virtuelles du déterminant de Hartree-Fock. Si une seule spinorbitale diffère, on la décrit comme un déterminant d'excitation simple. Si deux spinorbitales diffèrent, elles sont décrites comme un déterminant d'excitation double et ainsi de suite. les indices a,b,c ... représentent les spinorbitales occupées dans le calcul HF et p,q,r ... pour les spinorbitales virtuelles et les coefficients c représentent le poids des différentes configurations. Une méthode *ab initio* dans laquelle la fonction d'onde est exprimée sous la forme de l'équation (2.21) est appelée *Interaction de Configuration (CI)*. Dans la pratique, il est impossible de gérer un ensemble infini de déterminants de Slater à N électrons, avec chacun des déterminants contruit à partir d'un ensemble infini de spin-orbitales. En outre, le calcul devient très coûteux (à la fois pour le temps de calcul que pour l'espace de stockage de l'ordinateur) pour gérer un nombre extrêmement important de déterminants. Ce dernier problème est légèrement réduit par l'observation faite que le nombre de déterminants dans l'équation (2.21) peut souvent être réduit en fonction de la symétrie. Un autre point est la difficulté de réaliser des calculs de structure moléculaire de façon fiable, même si nous pouvons inclure toutes les CSF dans l'équation (2.21), nous devons aussi rappeler que les CSF sont construites à partir d'un ensemble fini de fonctions de base. Un calcul est défini comme une IC complète (Full CI) si toutes les CSF sont utilisées pour un ensemble de bases finies données.

On peut écrire l'équation (2.21) sous une forme plus simple :

$$\Psi = \sum_{J=1}^L C_J \Psi_J \quad (2.22)$$

Les coefficients C_J sont déterminés par minimisation variationnelle, cette minimisation est équivalente à la résolution d'un ensemble d'équations simultanées pour ces coefficients :

$$\sum_{J=1}^L H_{IJ} C_J = E \sum_{J=1}^L S_{IJ} C_J \quad (2.23)$$

Où :

$$H_{IJ} = \int \Psi_I^* H \Psi_J d\tau \quad S_{IJ} = \int \Psi_I^* \Psi_J d\tau \quad (2.24)$$

La notation $\int \cdots d\tau$ implique une intégration sur les coordonnées spatiales et de spin. L'ensemble de ces deux équations peut être écrit en notation matricielle :

$$\mathbf{H}\mathbf{C} = \mathbf{E}\mathbf{S}\mathbf{C} \quad (2.25)$$

où \mathbf{C} est une matrice de coefficients de dimension $L \times L$. Parce que les déterminants de Slater forment un ensemble orthonormé ($S_{IJ} = \delta_{IJ}$), l'équation devient :

$$\mathbf{H}\mathbf{C} = \mathbf{E}\mathbf{C} \quad (2.26)$$

Cette équation matricielle peut être résolue par la diagonalisation de \mathbf{H} .

2.4.2 Champ multi-configurationnel auto-cohérent (MCSCF)

Dans les méthodes d'IC décrites dans la section précédente, les coefficients C_J des équations (2.22) sont déterminés dans un premier calcul HF-SCF et maintenus fixes dans le calcul d'IC. Dans la méthode dite du Champ multi-configurationnel auto-cohérent (MCSCF), ces coefficients sont optimisés. Le développement de la méthode MCSCF est particulièrement important pour les états excités, une des procédures les plus appropriées est la méthode du champ auto-cohérent de l'espace actif complet (complete active space SCF (CASSCF)), dans laquelle les fonctions d'onde spatiales sont divisées en trois catégories :

- Un ensemble d'**orbitales inactives** composées des fonctions d'onde spatiales qui sont doublement occupées dans tous les déterminants inclus dans l'équation (2.22).
- Un ensemble d'**orbitales virtuelles** composées des fonctions d'onde spatiales qui sont inoccupées dans tous les déterminants.
- Un ensemble d'**orbitales actives** qui sont énergétiquement intermédiaires entre les orbitales inactives et virtuelles.

Dans un calcul MCSCF [52] on optimise simultanément les coefficients C_J et les coefficients des orbitales moléculaires entrant dans la construction des déterminants.

Les étapes élémentaires dans un calcul MCSCF sont premièrement : partir de préférence d'une fonction d'onde initiale appropriée (par exemple les orbitales moléculaires d'un calcul SCF), puis choisir les configurations à inclure dans la fonction d'onde. Ensuite il faut minimiser l'énergie MCSCF.

Le problème le plus important est le choix de l'espace des configurations. Etant donné que le nombre de configurations intervenant dans ce type de calcul doit rester limité, il est impossible d'utiliser cette méthode lorsque le choix nécessite l'inclusion d'un grand nombre de configurations. La méthode Complete Active Space SCF (CASSCF) est une solution à ce problème.

La méthode CASSCF a été introduite par Roos et Siegbahn [53, 54] et Ruedenberg [55, 56] au début des années 80. Dans cette méthode on utilise toutes les configurations construites sur un groupe d'OM en nombre limité. Le calcul favorisera celles de plus gros poids pour un état donné.

La dimension de l'espace configurationnel est fixée par le nombre de possibilités de mettre n électrons dans m orbitales. Cette dimension croît très vite avec le nombre d'orbitales actives.

La fonction d'onde CASSCF possède de nombreux avantages :

- Elle est « size-consistent ¹ ».
- Elle est invariante par transformation unitaire dans l'espace actif.

2.4.3 Théorie de perturbation de Rayleigh-Schrödinger

Dans la méthode RSPT (Théorie de perturbation de Rayleigh-Schrödinger) l'équation que nous voulons résoudre est :

$$\hat{H}\Psi_n = E_n\Psi_n \quad (2.27)$$

où \hat{H} représente l'hamiltonien de notre système et Ψ_n est une fonction propre exacte de l'hamiltonien. Afin d'être en mesure d'appliquer RSPT à ce problème, nous séparons l'hamiltonien en deux parties :

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda\hat{V} \quad (2.28)$$

\hat{H}_0 est connu comme l'hamiltonien non perturbé ou l'hamiltonien d'ordre zéro, tandis que \hat{V} est appelé la perturbation, il est supposé faible par rapport à \hat{H}_0 . Ici, nous avons introduit le paramètre λ , qui est supposé être seulement un terme réel avec une valeur comprise entre 0 et 1.

Si λ est égal à zéro, l'équation (2.27) se réduit à l'équation d'ordre zéro :

$$\hat{H}_0\Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)}\Psi_n^{(0)} \quad (2.29)$$

On écrit ensuite :

1. Une fonction est dite « size-consistent » si l'énergie de corrélation croît linéairement avec le nombre de particules et si, lorsque les M fragments du système sont à l'infini, la fonction d'onde se réduit bien à un produit de fonctions locales de chacun des fragments.

$$\begin{aligned} E_n &= E_n^{(0)} + \Delta E_n \\ \Psi_n &= \Psi_n^{(0)} + \Delta \Psi_n \end{aligned} \quad (2.30)$$

Ces deux expressions peuvent être écrites comme un développement en puissance de λ :

$$E_n = E_n^{(0)} + \lambda E_n^{(1)} + \lambda^2 E_n^{(2)} + \lambda^3 E_n^{(3)} + \dots \quad (2.31)$$

$$\Psi_n = \Psi_n^{(0)} + \lambda \Psi_n^{(1)} + \lambda^2 \Psi_n^{(2)} + \lambda^3 \Psi_n^{(3)} + \dots \quad (2.32)$$

On pose :

$$\langle \Psi_n^{(0)} | \Psi_n^{(m)} \rangle = \delta_{m0} \quad (2.33)$$

On introduit les expressions de E_n et Ψ_n dans les équations (2.31) et (2.32) dans l'équation (2.27) et on identifie les coefficients du développement en puissance. On obtient un nombre infini d'équations de la forme :

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(0)} \quad (2.34)$$

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(1)} + \hat{V} \Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(1)} + E_n^{(1)} \Psi_n^{(0)} \quad (2.35)$$

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(2)} + \hat{V} \Psi_n^{(1)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(2)} + E_n^{(1)} \Psi_n^{(1)} + E_n^{(2)} \Psi_n^{(0)} \quad (2.36)$$

$$\hat{H}_0 \Psi_n^{(3)} + \hat{V} \Psi_n^{(2)} = E_n^{(0)} \Psi_n^{(3)} + E_n^{(1)} \Psi_n^{(2)} + E_n^{(2)} \Psi_n^{(1)} + E_n^{(3)} \Psi_n^{(0)} \quad (2.37)$$

En tenant compte de l'orthogonalité (2.33), on obtient une série d'équations :

$$E_n^{(0)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{H}_0 | \Psi_n^{(0)} \rangle \quad (2.38)$$

$$E_n^{(1)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(0)} \rangle \quad (2.39)$$

$$E_n^{(2)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(1)} \rangle \quad (2.40)$$

$$E_n^{(3)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(2)} \rangle \quad (2.41)$$

\vdots

$$E_n^{(m)} = \langle \Psi_n^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(m-1)} \rangle \quad (2.42)$$

H_0 est un opérateur hermitien et dispose d'un ensemble de solutions non dégénérées qui sont orthogonales et forment un espace complet. $\Psi_n^{(0)}$ est une de ces solutions. Tout vecteur orthogonal peut être exprimé comme une combinaison linéaire de toutes les autres solutions de l'équation aux valeurs propres $\{\Psi_n^{(0)}\}$:

$$\Psi_n^{(m)} = \sum_l C_{n,l}^{(m)} \Psi_l^{(0)} \quad (2.43)$$

Où

$$C_{n,l}^{(m)} = \langle \Psi_l^{(0)} | \Psi_n^{(m)} \rangle \quad (2.44)$$

Pour $m = 1$ les coefficients sont obtenus uniquement avec les solutions de l'ordre de zéro. La multiplication à gauche de l'équation (2.35) par $\langle \Psi_l^{(0)} |$, donne :

$$(E_n^{(0)} - E_l^{(0)}) \langle \Psi_l^{(0)} | \Psi_n^{(1)} \rangle = \langle \Psi_l^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(0)} \rangle \quad (2.45)$$

Donc

$$C_{n,l}^{(1)} = \frac{\langle \Psi_l^{(0)} | \hat{V} | \Psi_n^{(0)} \rangle}{(E_n^{(0)} - E_l^{(0)})} \quad (2.46)$$

Les corrections d'ordre supérieur peuvent être obtenues d'une manière similaire avec des expressions de plus en plus complexes.

On peut envisager un grand nombre de façons dont l'hamiltonien d'un système de particules peut être partitionné. Il existe plusieurs méthodes de perturbations, elles se distinguent par la fonction d'onde d'ordre zero. La théorie des perturbations Møller-Plesset utilise une fonction d'onde de référence mono-déterminantale issue d'un calcul HF et la méthode CASPT2 utilise une fonction d'onde CASSCF multi-déterminantale, dans ces deux cas on a :

$$E_{MP2} = E_{HF} + E^{(2)} \quad (2.47)$$

$$E_{CASPT2} = E_{CASSCF} + E^{(2)} \quad (2.48)$$

2.5 Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

Dans la Théorie de la fonctionnelle de la densité (Density Functional Theory, DFT) proposée par Hohenberg et Kohn [57, 58] on calcule les propriétés de l'état fondamental, dont l'énergie, à partir de la densité électronique $n(\vec{r})$ et non pas de la fonction d'onde multi-électronique. Alors que la fonction d'onde dépend de $3N$ variables, la densité est seulement fonction de trois variables, ce qui réduit considérablement les temps de calculs et permet d'étudier des systèmes de grandes tailles hors de portée des autres méthodes basées sur la fonction d'onde.

2.5.1 Théorèmes de Hohenberg-Kohn

La densité électronique d'un système à n électrons associée à une fonction d'onde $\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$ est donnée par l'expression suivante :

$$\rho(\vec{r}) = \int |\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)|^2 d\vec{r}_1 \dots d\vec{r}_n \quad (2.49)$$

où ρ est normée à n . La DFT repose sur deux théorèmes de Hohenberg et Kohn [57]. Ces théorèmes démontrent que toutes les propriétés d'un système dans son état fondamental sont complètement déterminées par sa densité $\rho(\vec{r})$, elle-même étant obtenue par un principe variationnel appliqué à la fonctionnelle énergie du système $E[\rho]$.

La densité électronique $\rho(\vec{r})$ est la seule fonction nécessaire pour obtenir toutes les propriétés électroniques d'un système quelconque. On peut exprimer l'énergie de l'état fondamental comme une fonctionnelle de la densité :

$$\begin{aligned} E[\rho_0] &= T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \\ &= T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + \int \rho_0(\vec{r}) V_{Ne} d\vec{r} \end{aligned} \quad (2.50)$$

On définit la fonctionnelle de Hohenberg et Kohn $F_{HK}[\rho]$ comme :

$$\begin{aligned} F_{HK}[\rho] &= T[\rho] + E_{ee}[\rho] \\ &= \langle \Psi | \hat{T} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle \end{aligned} \quad (2.51)$$

Cette nouvelle fonctionnelle contient l'énergie cinétique électronique $T[\rho]$ et l'énergie potentielle due à l'interaction entre les électrons $E_{ee}[\rho]$. Les expressions explicites de ces deux fonctionnelles ne sont pas connues. Par contre, nous connaissons la partie classique de l'interaction entre électrons

Dans la théorie de Kohn et Sham [58], la fonctionnelle $E[\rho]$ est réécrite sous une forme qui fait intervenir la contribution cinétique T_0 d'un système de particules non-interagissantes et la contribution coulombienne d'un système classique :

$$E[\rho] = T_0[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\vec{r}) \rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r} d\vec{r}' + \int \rho(\vec{r}) v(\vec{r}) d\vec{r} + E_{xc}[\rho] \quad (2.52)$$

La fonctionnelle E_{xc} est appelée fonctionnelle d'échange-corrélation. Elle contient les contributions à la corrélation et l'échange de l'énergie cinétique (correction par rapport au système d'électrons non-interagissant) et la partie non classique de l'interaction électron-électron (corrélation et échange). Dans cette approche, on introduit les orbitales Kohn-Sham monoélectroniques solutions d'un hamiltonien monoélectronique comportant le potentiel créé par les noyaux, l'interaction coulombienne entre les électrons et le potentiel d'échange-corrélation. Il prend une forme fonctionnelle de la densité électronique recherchée. Les équations de Kohn-Sham sont alors résolues de manière itérative.

La principale difficulté de la DFT réside dans la détermination de la fonctionnelle échange-corrélation E_{xc} (équation 2.52) dont l'expression analytique exacte n'est pas connue. On cherche donc des approximations qui permettent de décrire convenablement les propriétés étudiées.

Ceci conduit à une grande variété de fonctionnelles.

2.6 Erreur de superposition de base

Les bases d'orbitales atomiques utilisées dans les calculs de chimie quantique ne comportent qu'un nombre fini de fonctions. L'évaluation de l'énergie exacte nécessiterait, outre un calcul d'IC complet, une base infinie, comprenant un nombre infini de fonctions. L'erreur de superposition de base (*Basis Set Superposition Error pour BSSE*) provient du caractère fini des bases.

Soient deux systèmes : A décrit avec une base d'orbitales atomiques a , et B décrit avec une base b . Lorsque qu'on veut faire des calculs sur le complexe AB formé par les deux systèmes on utilise l'ensemble des deux bases (noté ab), et l'énergie de liaison du complexe est donnée par l'expression :

$$\Delta E_{liaison} = E(AB)_{ab}^* - E(A)_a - E(B)_b \quad (2.53)$$

La géométrie du complexe est dénotée par le symbole étoile (*).

On remarque que la base du système (ab) n'est pas la même que la base des systèmes isolés. Le nuage électronique du système A présent dans le complexe AB va donc être décrit non seulement par les fonctions composant la base a , mais aussi par les fonctions de la base b alors que les systèmes isolés seront dans leur propre base. On a donc un abaissement artificiel de l'énergie du complexe AB qui est nommé erreur de superposition de base.

Pour corriger cette erreur, on applique la méthode du *Counterpoise Correction (CP)* introduit par BOYS ET BERNARDI[59]. Pour estimer cette correction, il faut calculer quatre contributions énergétiques. En utilisant la base a pour le système A , et la base b pour le système B , on calcule l'énergie de ces deux systèmes avec la géométrie qu'ils ont dans le complexe, c'est-à-dire on calcule $E(A)_a^*$ et $E(B)_b^*$. Ensuite, on évalue l'énergie de A avec la base ab , sans la présence de B : $E(A)_{ab}^*$. On réalise la même opération pour le système B . La correction est définie par :

$$\Delta E_{CP} = E(A)_{ab}^* + E(B)_{ab}^* - E(A)_a^* - E(B)_b^* \quad (2.54)$$

L'énergie de liaison corrigée par la méthode *Counterpoise Correction* est donnée par :

$$\Delta E_{CP}^{liaison} = \Delta E_{liaison} - \Delta E_{CP} \quad (2.55)$$

Chapitre 3

État excité du chromophore

Pour améliorer la description de la dynamique du chromophore à l'état excité de la YFP, nous cherchons à développer un nouveau champ de force décrivant les interactions entre le chromophore à l'état excité et le groupement phénol d'une tyrosine en π -stacking. Dans ce chapitre, nous allons décrire la stratégie adoptée pour obtenir au niveau quantique le premier état excité du chromophore et du système chromophore-phénol dans différentes géométries de π -stacking. Nous comparerons l'énergie de transition $S0 \rightarrow S1$ du système chromophore-phénol à la transition électronique observée expérimentalement dans la YFP.

3.1 Choix de la méthode de calcul

L'énergie d'un système s'écrit :

$$E = T + E_{NN} + E_{eN} + E_{ee} \quad (3.1)$$

avec T représentant l'énergie cinétique et E_{NN} , E_{eN} et E_{ee} représentant respectivement les énergies d'interaction entre les noyaux, noyaux-électrons et les électrons.

Dans l'approximation SCF, Le terme E_{ee} peut se décomposer en une partie coulombienne J et une partie définissant l'échange K et l'énergie électronique s'écrit :

$$E_{scf} = \sum_{i=occ} T_i + E_{eN} + \sum_{i \leq j} J_{ij} - K_{ij} \quad (3.2)$$

où :

$$\begin{aligned} i & : \text{indice de spin orbitales } \phi_i(X_1) \\ J_{ij} & = \int dX_1 dX_2 \frac{1}{r_{12}} \phi_i(X_1)^2 \phi_j(X_2)^2 \langle \sigma_i | \sigma_i \rangle \langle \sigma_j | \sigma_j \rangle \\ K_{ij} & = \int dX_1 dX_2 \frac{1}{r_{12}} \phi_i(X_1) \phi_i(X_2) \phi_j(X_1) \phi_j(X_2) \langle \sigma_i | \sigma_j \rangle^2 \end{aligned}$$

Dans cette approximation, il y a une compensation entre J_{ii} la « self energy » et K_{ii} l'intégrale d'échange mais on ne décrit pas tout la corrélation électronique.

Tandis que dans la méthode DFT l'énergie électronique est séparée en plusieurs parties : E_{eN} est calculée exactement, et le reste est calculé d'une façon approximative à l'aide de fonctionnelles de la densité.

L'énergie totale DFT s'écrit alors :

$$E_{DFT} = E_{Ne}(\rho) + T_S(\rho) + J(\rho) + E_{xc}(\rho) \quad (3.3)$$

L'énergie DFT atteindra l'énergie exacte si et seulement si le terme E_{xc} (énergie d'échange et de corrélation) est calculé exactement. Tout le but des développements récents dans le cadre des méthodes de la Fonctionnelle de la Densité est donc de trouver au mieux cette partie d'échange-corrélation.

C'est difficile de trouver une expression qui soit à la fois opérationnelle et exacte, de plus il n'y a pas de compensation exacte entre la self energy et l'échange.

La méthode DFT permet aujourd'hui à l'aide de fonctionnelles adaptées et de termes de correction de dispersion de décrire concrètement les forces de dispersion et les interactions de π -stacking. Cependant, nous avons besoins de caractériser l'interaction entre les deux molécules conjuguées chromophore et phénol avec le chromophore dans le premier état excité. A terme, il sera sans doute nécessaire de considérer des géométries variées du chromophore c'est-à-dire plane mais aussi twistées autour des deux liaisons reliant le cycle phénolate et le cycle imidazolinone.

Pour ces raisons on a choisi de travailler avec une méthode CASSCF où la corrélation électronique est mieux décrite que dans la méthode SCF. L'inconvénient de cette approche tient au fait qu'elle est coûteuse en temps de calcul.

Calcul de chimie quantique « CASPT2 » du chromophore isolé

Dans notre groupe, la méthode de chimie quantique dite CASPT2 a déjà été utilisée [23], avec succès, pour construire une surface de potentiel du chromophore anionique de la GFP à l'état excité. Cette surface a été ensuite utilisée pour étudier l'extinction de la fluorescence due à une torsion autour des deux liaisons centrales du chromophore.

La matrice d'IC du calcul CASSCF comprend toutes les configurations possibles qui peuvent être générées par l'espace actif défini par m électrons et n orbitales : CAS(m,n). Une simple minimisation de l'énergie de l'état excité S_1 peut créer des problèmes de convergences dûs à une inversion entre l'énergie de l'état fondamental et l'état excité. Ce phénomène vient du fait que l'énergie de S_0 augmente quand on optimise les orbitales pour l'état excité S_1 . Afin d'éviter ce problème nous avons utilisé un calcul CASSCF moyenné sur deux états (SA2-CASSCF) où la moyenne des énergies est minimisée.

L'espace actif complet du chromophore contient 16 électrons et 14 orbitales π . Cet espace est très grand et son utilisation prendrait beaucoup de temps. Donc nous avons cherché à

utiliser un espace réduit « minimal ».

Dans nos calculs, nous avons choisi de travailler avec un espace actif réduit CAS(4,3) et ce choix vient du fait que des études théoriques [60, 61] ont montré que la fonction d'onde électronique du chromophore anionique peut être décrite à l'aide de trois structures analogues à celles de l'anion allylique (figure 3.1).

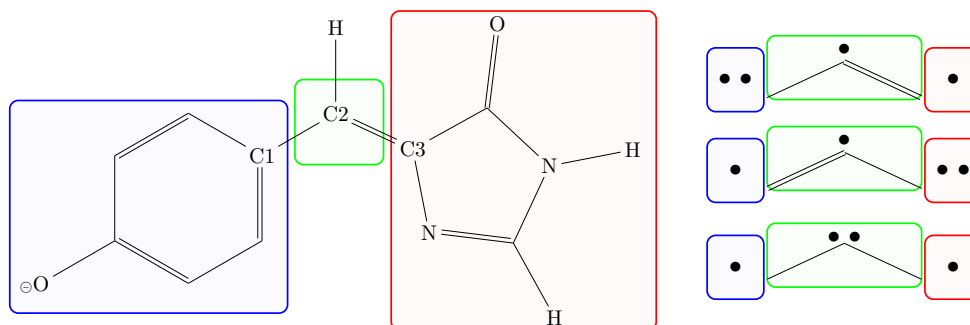


FIGURE 3.1: A gauche : le chromophore anionique de la GFP avec les noms des trois atomes centraux affichés. A droite : trois structures mésomères d'un ion allylique. L'analogie avec le chromophore peut être faite si les deux carbones terminaux sont remplacés par les deux cycles du chromophore.

Cette description contient deux structures P et I présentant une double liaison soit sur la liaison C3-C2 soit sur la liaison C2-C1 et une troisième structure B avec deux électrons non appariés : un sur l'atome C1 et l'autre sur l'atome C3. Ce genre de structures mésomères peut être trouvé dans des systèmes avec trois orbitales et quatre électrons [62]. Sauf si une des liaisons est allongée, la troisième structure a un poids plus petit dans l'état fondamental et l'état excité que les structures P et I. Notre besoin pour décrire le premier état excité est d'utiliser 3 orbitales (HOMO-1, HOMO et LUMO)¹ et 4 électrons π (figure 3.2).

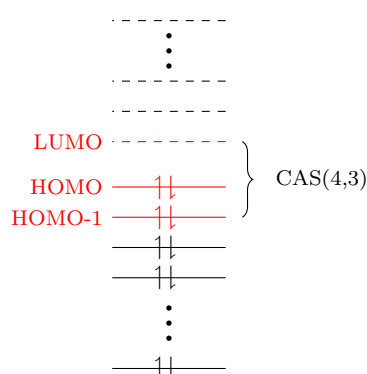


FIGURE 3.2: Espace CAS

1. HOMO : l'orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée, HOMO-1 : l'orbitale moléculaire juste en dessous de la plus haute en énergie occupée, LUMO : l'orbitale la plus basse en énergie non occupée.

La première étape du calcul CASSCF c'est l'optimisation des orbitales, ce qui veut dire que dans les orbitales frontières on trouve des orbitales de type π du chromophore parce qu'elles sont les plus basses en énergie donc forcément on va avoir des transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$ dans le chromophore (excitation locale).

Dans l'étude menée par Jonasson *et al.* [23], il a été montré que les résultats obtenus à l'aide d'un espace actif réduit sont en très bon accord avec les résultats obtenus avec un espace actif plus grand CASSCF(12,11)-PT2. Pour cela, ils ont effectué des calculs dans des géométries représentatives des minima TwP et TwI (figure 1.4) ainsi que les hauteurs du maximum HT et ils ont comparé leur résultats avec d'autres calculs CASPT2 faits dans un espace actif plus grand (tableau 3.1). Les calculs CASSCF/CASPT2 ont été effectués en utilisant les programmes MOLPRO [63].

	TwP	TwI	HT
SA2-CAS(4, 3) ^a	-14.7	-18.9	-9.2
SA2-CAS(4, 3) – PT2 ^a	-6.0	-9.7	4.8
SA2-CAS(12, 11) ^b	-8.6	-11.3	0.1
SA2-CAS(12, 11) – PT2 ^b	-7.2	-8.9	4.9

TABLE 3.1: Energies (en kcal/mol) des géométries représentatives des minima de l'état S1 du chromophore anionique (HBI ou le dérivé diméthylque HDBI selon la référence), pour chaque calcul, le zéro d'énergie est l'énergie de l'état S1 plan. a : Jonasson et *al.*[23] b : Martin et *al.*[39].

On calcule l'énergie de transition pour le chromophore isolé en utilisant la méthode SA2-CAS(4,3)-PT2 dans la base 6-31G*, on a obtenu une énergie de transition égale à 2.88 eV, qu'on peut la comparer avec d'autres résultats théoriques.

CAS (n,m)	6-31G*	cc-pVDZ	cc-pVTZ
2,2	2.84	2.81	2.70
4,4	3.06	3.06	2.94
6,6	3.00	3.01	2.93
8,8	2.99	3.01	2.91
10,10	2.98	3.00	2.92
12,12	2.94	2.96	2.87
14,14	2.95	2.96	2.88

TABLE 3.2: Energie d'excitation avec CASPT2 (eV) pour le chromophore anionique obtenue pour différents ensembles de base et CAS(n,m) avec n : nombre d'électrons et m : nombre d'orbitales

Dans le tableau 3.2 nous rapportons les principaux résultats des calculs CASPT2 obtenus dans l'étude de Filippi *et al.*[64] pour le chromophore présenté dans la figure 3.13a.

Ils ont effectué ces calculs avec différentes tailles de l'espace actif ainsi que différents ensembles de base, ils ont utilisé les ensembles de base cc-pVDZ et cc-pVTZ ainsi que 6-31G*.

On remarque que la dépendance de l'énergie d'excitation CASPT2 sur la taille du CAS n'est pas très forte : si on compare les résultats obtenus avec la même base d'orbitales atomiques on voit une différence de l'ordre de 0.1 eV entre les calculs avec le plus haut niveau de calcul (CAS(14,14) le calcul avec le plus bas niveau. Les ensembles de base 6-31G* et cc-pVDZ donnent des énergies d'excitation comparables, mais en employant la base cc-pVTZ on abaisse de façon systématique l'excitation d'environ 0.1 eV. Ils ont aussi fait des calculs avec un autre modèle du chromophore avec des terminaisons CH_3 . (figure 3.13b) Ils ont trouvé une énergie égale à 2.92 eV avec un CAS(14,14) dans la base cc-pVDZ, ce qui fait un écart de 0.04 eV avec l'autre modèle. Cela ne surprend pas puisque les deux chromophores ne diffèrent que par la terminaison.

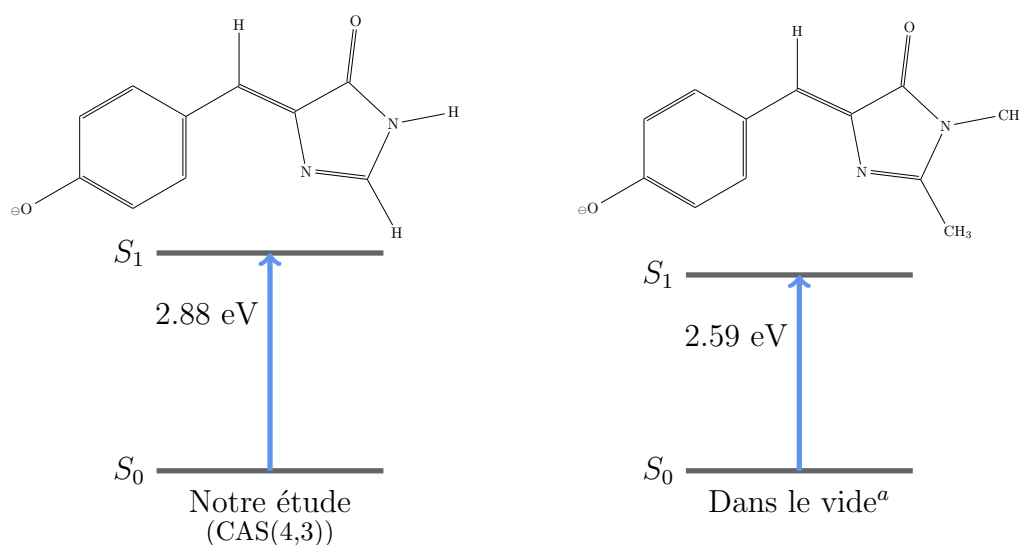


FIGURE 3.3: Diagramme des énergies d'excitation. a : Nielsen *et al.*[2].

Par ailleurs, on connaît la valeur expérimentale de l'énergie d'excitation du chromophore anionique avec des terminaisons CH_3 dans le vide [2] : elle vaut 2.59 eV. Notre résultat (pur le chromophore avec des terminaisons hydrogène) est 2.88 eV donc 0.29 eV trop haut. Le résultat de Filippi *et al* avec le chromophore fermé par des CH_3 et le niveau CAS(14,14) est 2.92 eV et n'est pas en meilleur accord. (figure 3.3). Avec des méthodes de plus haut niveau il est possible de se rapprocher de la valeur expérimentale. Par exemple Olsen et Smith[40] ont obtenu la valeur 2.68 eV et Polyakov *et al*[37] ont obtenu 2.51 eV. Mais ces méthodes sont beaucoup trop lourdes pour notre travail car on doit faire des calculs pour le dimère chromophore-tyrosine et pour un très grand nombre de géométries. Donc nous avons choisi d'effectuer tous les calculs CASPT2 au niveau SA2-CAS(4,3)-PT2 en base 6-31G* pour le système chromophore-phénol.

3.2 Analyse des simulations de dynamique moléculaire de la YFP

Dans ce paragraphe, nous allons chercher dans quelles géométries de l'ensemble chromophore-tyrosine nous allons effectuer les calcul de chimie quantique. Pour cela nous avons étudié le

mouvement de la tyrosine 203 par rapport au chromophore dans une simulation de dynamique moléculaire de durée 12 ns de la YFP avec le chromophore à l'état fondamental, effectuée précédemment dans notre groupe [23]. Pour cette étude, on place un système d'axes (U_c, V_c, W_c) centré sur le phénolate du chromophore et un autre (U_t, V_t, W_t) centré sur le phénol de la tyrosine comme montré dans la figure 3.4 :

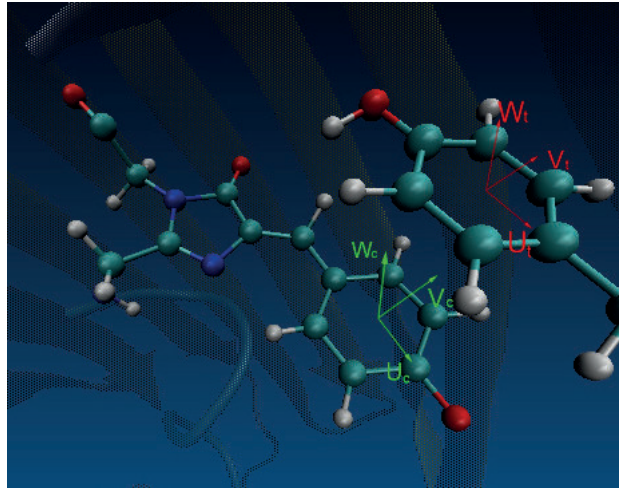


FIGURE 3.4: Les systèmes d'axes (U_c, V_c, W_c) du chromophore et (U_t, V_t, W_t) de la tyrosine.

On distingue deux types de mouvements : la translation et la rotation.

3.2.1 Translations

Chaque translation suivant un axe est définie par la projection du vecteur qui relie les deux origines des axes dans le système d'axes XYZ (figure 3.5) :

- Projection sur U_c : translation suivant X.
- Projection sur V_c : translation suivant Y.
- Projection sur W_c : translation suivant Z.

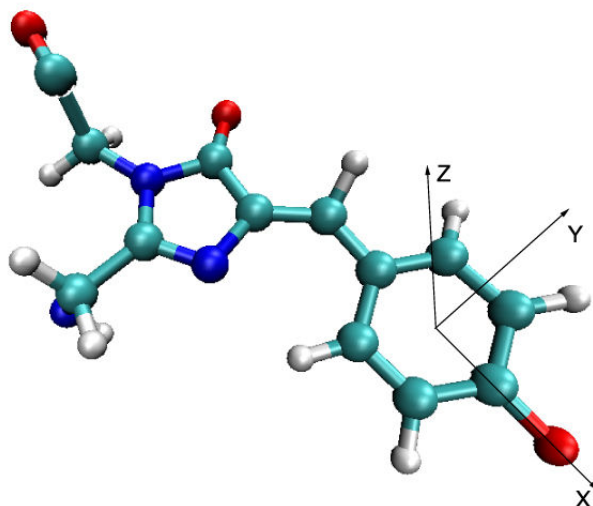


FIGURE 3.5: Système d'axes XYZ

Dans la simulation de dynamique moléculaire les géométries ont été écrites sur un fichier toutes les 2 ps, nous avons donc 6000 géométries du dimère chromophore-tyrosine. Nous avons calculé les valeurs des translations suivant X, Y et Z pour toutes ces géométries, elles sont présentées dans les histogrammes des figures 3.6, 3.7 et 3.8 respectivement :

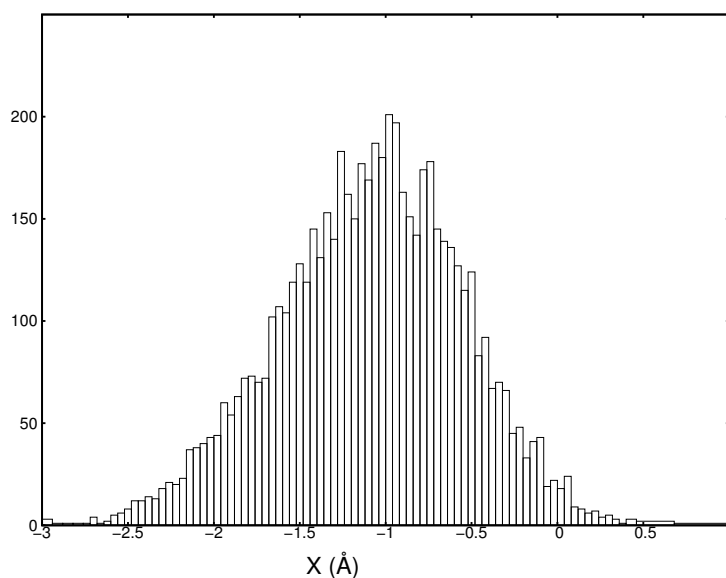


FIGURE 3.6: Histogramme des translations suivant X

La figure 3.6 représente la translation de la tyrosine suivant l'axe X. On remarque une bande large entre -2.5 et 0 Å. La valeur moyenne vaut -1.1 Å et l'écart type 0.5 Å

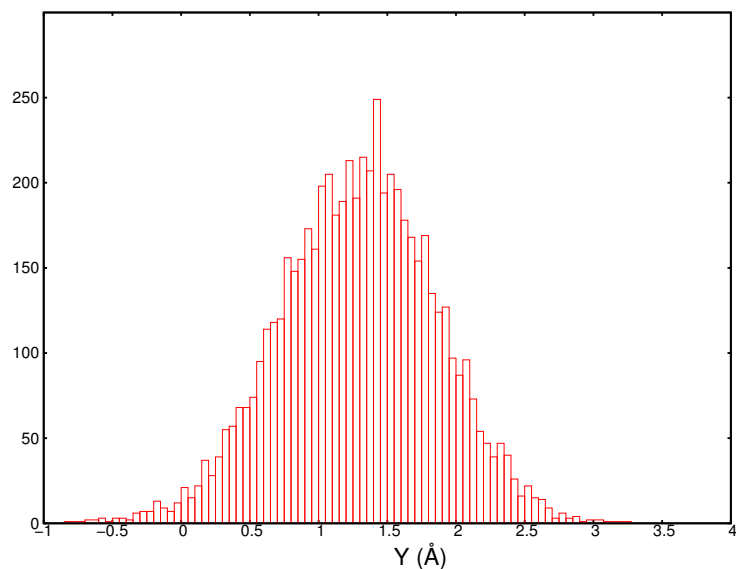


FIGURE 3.7: Histogramme des translations suivant Y

La figure 3.7 représente la translation de la tyrosine suivant l'axe Y. On remarque une bande large entre 0.5 et 2.5 Å. La valeur moyenne vaut 1.3 Å et l'écart type est le même que pour la translation suivant X : 0.5 Å ;

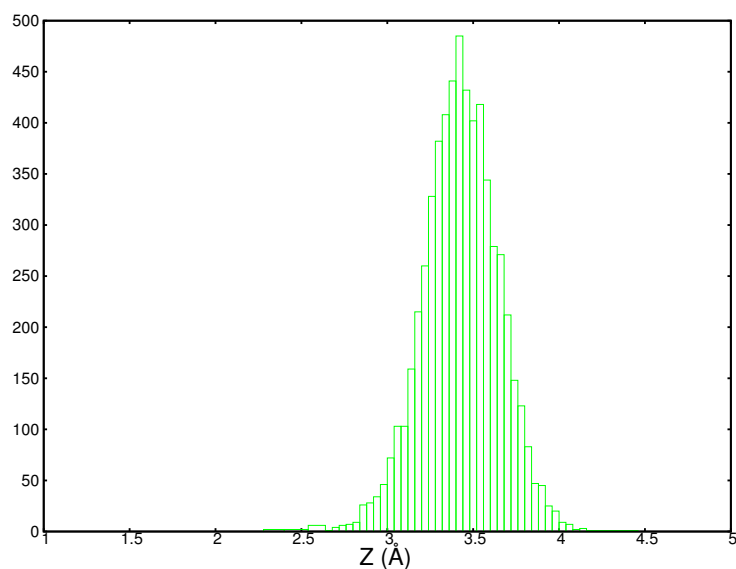


FIGURE 3.8: Histogramme des translations suivant Z

La figure 3.8 représente la translation de la tyrosine suivant l'axe Z. Elle présente un pic entre 3 Å et 4 Å, beaucoup plus étroit que pour X et Y. La valeur moyenne vaut 3.5 Å et l'écart-type 0.2 Å. Ceci signifie que la distance séparant les plans des deux molécules (phénolate du

chromophore et la tyrosine) ne varie pas beaucoup au cours de la simulation, contrairement aux deux autres translations (X, Y).

On peut conclure que la position la plus favorable suivant Z se situe dans un domaine restreint compris entre 3 et 3.8 Å. On peut localiser la géométrie moyenne de la tyrosine par rapport au chromophore, elle est caractérisée par $x = -1.1$ Å, $y = 1.3$ Å et $z = 3.4$ Å.

Dans la structure cristallographique de la YFP[25], qui est le point de départ de la simulation, ces grandeurs valent $x = -0.8$ Å, $y = 0.2$ Å et $z = 3.6$ Å. Ces valeurs de x et z sont donc très proches des valeurs moyennes dans la simulation, mais celle de y ne l'est pas : y moyen vaut 1.3 Å dans la simulation et 0.2 Å dans la structure cristallographique. Quand on regarde plus en détail les résultats de la simulation, on voit que le groupement OH de la tyrosine fait une liaison hydrogène avec le groupement NH₂ d'une glutamine (Gln69) qui se trouve du côté des y positifs. Dans la structure cristallographique cette liaison hydrogène n'existe pas. Quand elle se forme dans la dynamique cela déplace un peu la tyrosine vers la glutamine c'est à dire dans les sens y positif.

On peut aussi déterminer les dimensions de la grille qui sera plus large suivant X et Y.

3.2.2 Rotations

On a étudié deux types de rotation :

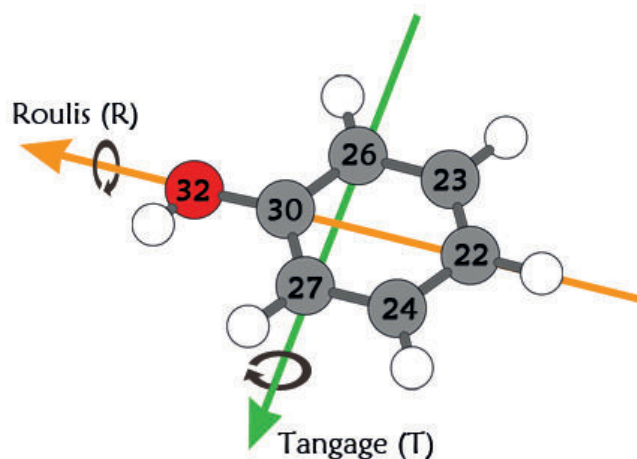


FIGURE 3.9: Les axes du tangage et du roulis

- Le tangage représente la rotation de la tyrosine par rapport au chromophore autour de l'axe T qui relie les atomes C26 et C27 (voir figure 3.9). Il est caractérisé par α qui est l'angle entre les deux axes U_t et U_c .
- Le roulis représente la rotation de la tyrosine par rapport au chromophore autour de l'axe R qui relie les atomes C22 et C30 (voir figure 3.9). Il est caractérisé par α qui est l'angle entre les deux axes V_t et V_c .

Le mouvement général de rotation est une combinaison de ces deux mouvements et d'un troisième qui est la rotation de la tyrosine autour de l'axe perpendiculaire à son plan.

Le tangage et le roulis sont présentés dans les histogrammes suivant :

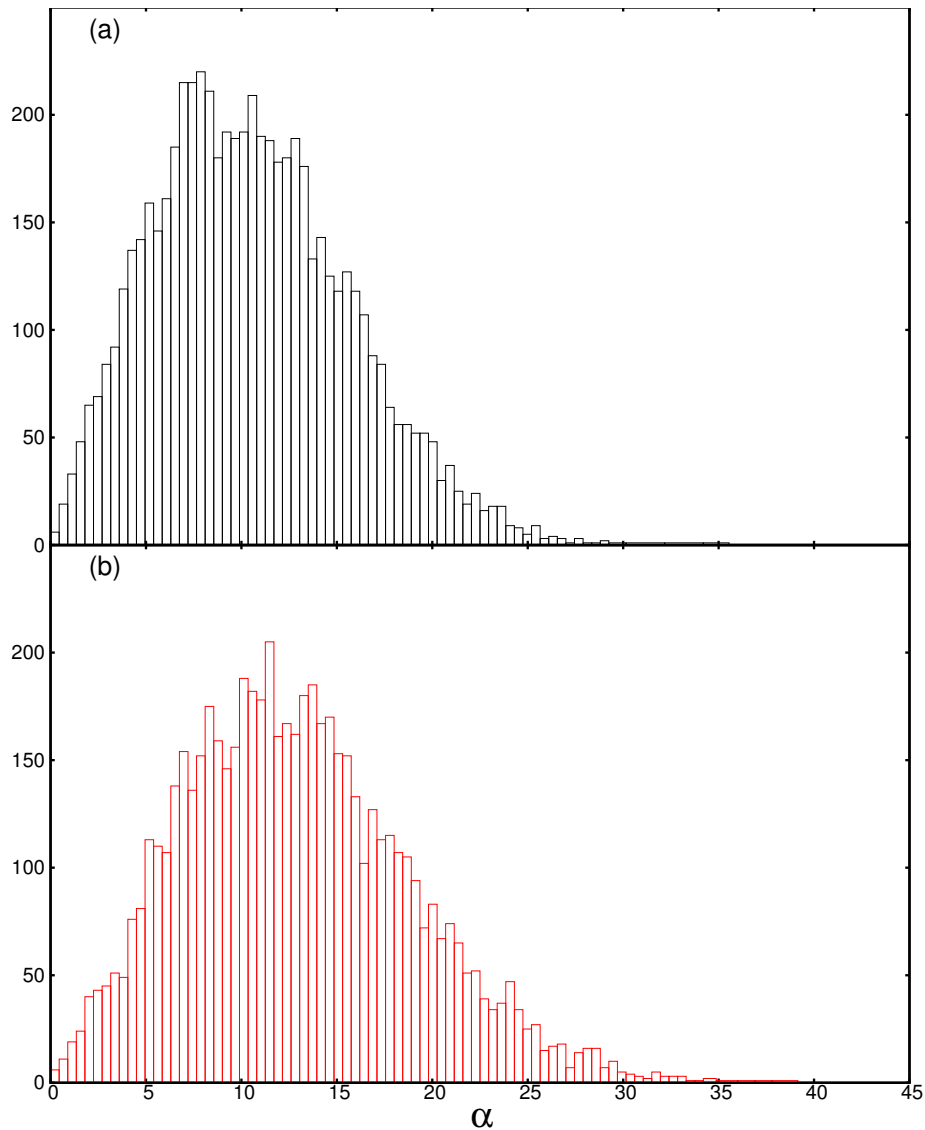


FIGURE 3.10: Histogramme de l'angle de tangage (a) et de l'angle de roulis (b).

La figure 3.10a représente α l'angle de rotation autour de l'axe de tangage (T) en valeur absolue, on remarque que cette rotation est aux alentours de 12° et qu'elle ne dépasse les 24° .

La figure 3.10b représente α l'angle de rotation autour de l'axe de roulis (R) en valeur absolue, on remarque aussi que pour le roulis elle est aux alentours de 12° et ne dépasse les 30° .

Les deux rotations (tangage et roulis) sont assez faibles par rapport à une rotation de 90° , et nous n'avons pas pris en compte ces mouvements. Nous ne considérerons que les mouvements de translation suivant X, Y et Z.

3.2.3 Dimension de la grille de points

Les résultats que nous avons obtenus, nous amènent à définir les domaines de la grille X comme l'intervalle compris entre la valeur moyenne moins l'écart type, et la valeur moyenne plus l'écart type : cela donne $X \in [-1.6, -0.6] \text{ \AA}$. De la même façon l'intervalle pour Y serait : $Y \in [0.8, 1.8] \text{ \AA}$ et pour Z : $Z \in [3.3, 3.7] \text{ \AA}$. Afin de bien décrire la surface de l'énergie d'interaction, on a pris des domaines plus large que celui visité en dynamique moléculaire. Et donc x et y seront compris entre -16 et +16 \AA , alors que z ne va prendre que 5 valeurs 3.3, 3.5, 3.8, 4.5 et 5.5 \AA . Dans la figure 3.11, nous donnons les points calculés ainsi que les dimensions de la grille suivant les axes X et Y pour une valeur donnée de Z.

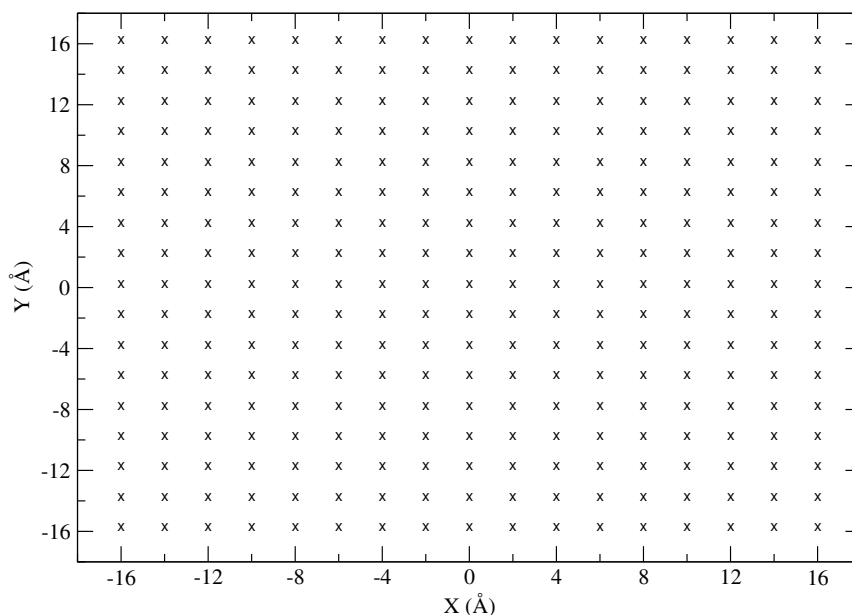


FIGURE 3.11: Les points de la grille suivant X et Y.

3.3 Energie de transition du système chromophore-phénol

Nous avons calculé l'énergie de transition entre l'état fondamental du chromophore et son état excité dans le système chromophore-tyrosine aux différents points de la grille ci-dessus. La tyrosine est en fait représentée seulement par son cycle phénol.

Les calculs ont été effectués en gardant les géométries d'équilibre des deux molécules séparées, en utilisant la méthode SA2-CAS(4,3)-PT2 décrite au début du chapitre, et la base 6-31G*.

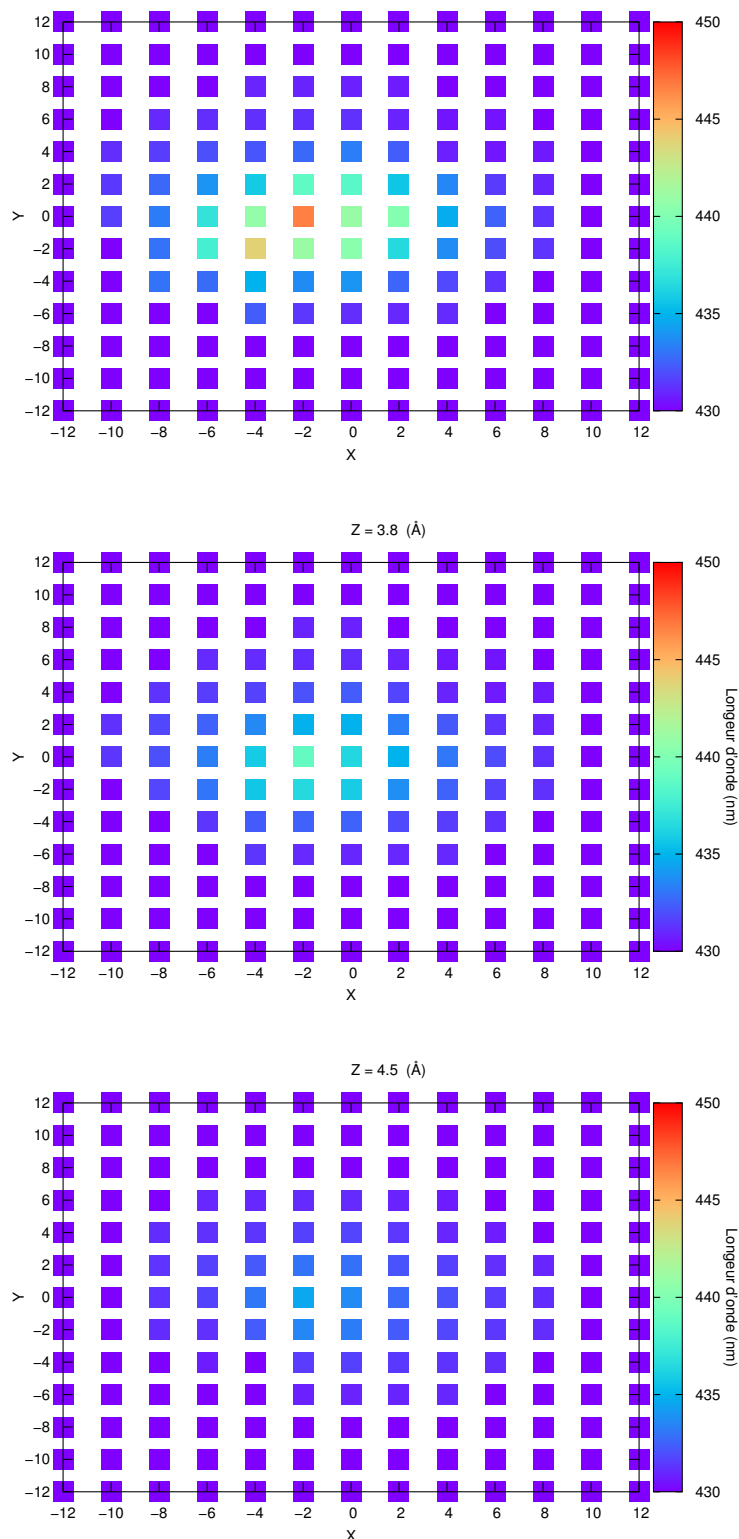


FIGURE 3.12: Energie de transition exprimée en longueur d'onde pour différentes distances de Z

Les figures 3.12 représentent les surfaces d'énergie de transition (exprimée par la longueur d'onde correspondante) en fonction des déplacements de la tyrosine par rapport au chromophore anionique (X, Y, Z). Les valeurs sont situées entre 430 nm (couleur bleu sombre) et 450

nm (couleur rouge), mais la grande majorité est située entre 430 nm et 435 nm. On constate que la plus grande longueur d'onde d'excitation (450 nm, qui correspond à une énergie de 2.75 eV) est présente dans la géométrie ($x = -1 \text{ \AA}$, $y = 0 \text{ \AA}$, $z = 3.3 \text{ \AA}$). Pour le chromophore anionique seul (figure 3.13a) nous avons obtenu la valeur 430 nm (2.88 eV).

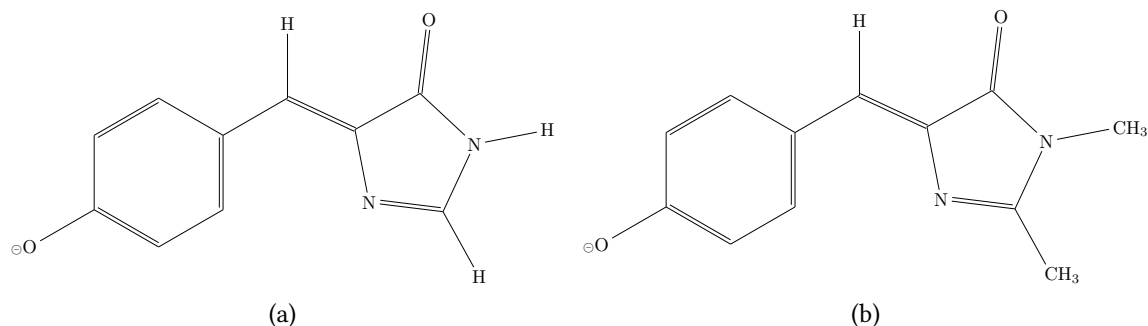


FIGURE 3.13: Le chromophore dans sa forme anionique, (a) : terminaison avec deux hydrogènes, (b) : terminaison avec deux groupes méthyle

Il apparaît expérimentalement, comme on a vu dans le chapitre 1 [8], que le chromophore anionique dans la GFP sauvage où il n'y a pas de π stacking avec une tyrosine absorbe à 489 nm et que dans la YFP il absorbe à 514 nm, il y a donc un décalage de 25 nm. Dans nos calculs le décalage est compris entre 0 nm et 20 nm suivant la position de la tyrosine par rapport au chromophore. Le décalage de 20 nm est très proche de la valeur expérimentale de 25 nm. Il est obtenu pour $x = -1 \text{ \AA}$, $y = 0 \text{ \AA}$, $z = 3.3 \text{ \AA}$. Cette géométrie est très proche de celle qu'on observe dans la structure cristallographique ($x = -0.8 \text{ \AA}$, $y = 0.2 \text{ \AA}$ et $Z = 3.6 \text{ \AA}$) et on peut donc penser que notre méthode de calcul donne des résultats en bon accord avec les résultats expérimentaux pour le décalage de l'énergie de transition du chromophore dû au π -stacking.

En conclusion, après avoir identifié les géométries représentatives dans la protéine, la méthode SA2-CAS(4,3)-PT2 nous permet de construire la surface d'énergie potentielle de système chromophore-phénol avec le chromophore à l'état excité. Ceci nous donne une représentation correcte des variations de l'énergie de transition électronique en fonction des positions relatives du chromophore et du phénol et donc de l'importance du π -stacking.

Chapitre 4

Énergie d'interaction

Dans ce chapitre, nous allons présenter les énergies d'interaction entre le chromophore dans son état fondamental ou son premier état excité et un phénol, obtenues soit en utilisant une méthode de chimie quantique (CASPT2) soit en utilisant un champ de force. Puis nous comparerons les deux résultats.

4.1 L'énergie d'interaction CASPT2

L'énergie d'interaction est calculée comme la différence entre l'énergie du système chromophore + tyrosine et les énergies calculées séparément du chromophore et de la tyrosine. Ainsi, une attraction prend des valeurs négatives alors qu'une interaction répulsive prend des valeurs positives.

Les résultats des énergies d'interaction ΔE pour chaque point sont calculés dans la base 6-31g* corrigée par la "Counterpoise corrections" (erreur de superposition des bases BSSE) à l'aide du package MOLPRO 2006.1 [63], comme suit :

$$\Delta E = E(Cro + Tyr)_{CT} - E(Cro)_{CT} - E(Tyr)_{CT} \quad (4.1)$$

Où :

- La base du système chromophore + tyrosine est notée CT
- $E(Cro + Tyr)_{CT}$ l'énergie globale du système dans sa base CT.
- $E(Cro)_{CT}$ l'énergie du chromophore anionique dans la base CT.
- $E(Tyr)_{CT}$ l'énergie de la tyrosine dans la base CT.

Nous avons calculé ΔE pour tous les points de la grille telle qu'elle a été définie dans le chapitre 3, définissant les positions relatives du chromophore et de la tyrosine représentée par son cycle phénol . Nous donnons ci-dessous les résultats sous forme de grille d'énergie d'interaction en fonction des positions x et y des 2 molécules et pour une altitude z donnée.

4.1.1 Interaction entre le chromophore à l'état fondamental et un phénol

La figure 4.1 représente la grille des énergies d'interaction calculées avec la méthode CASPT2 pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que l'énergie d'interaction la plus attractive ($-4 \leq \Delta E \text{ (kcal/mol)} \leq -1$) est située dans la région où $2 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$, alors que la région la plus répulsive ($0 \leq \Delta E \text{ (kcal/mol)} \leq 5$) est à peu près symétrique de la précédente. Il existe deux minima dans cette grille, obtenus pour $y = 4 \text{ \AA}$, $x = -2 \text{ \AA}$ et $y = 4 \text{ \AA}$, $x = 4 \text{ \AA}$, l'énergie y est de l'ordre de -3.06 et -2.96 kcal/mol respectivement. Ces deux minima se trouvent dans des géométries où la tyrosine est décalée par rapport au cycle phénol du chromophore (figure 4.11) vers y positif.

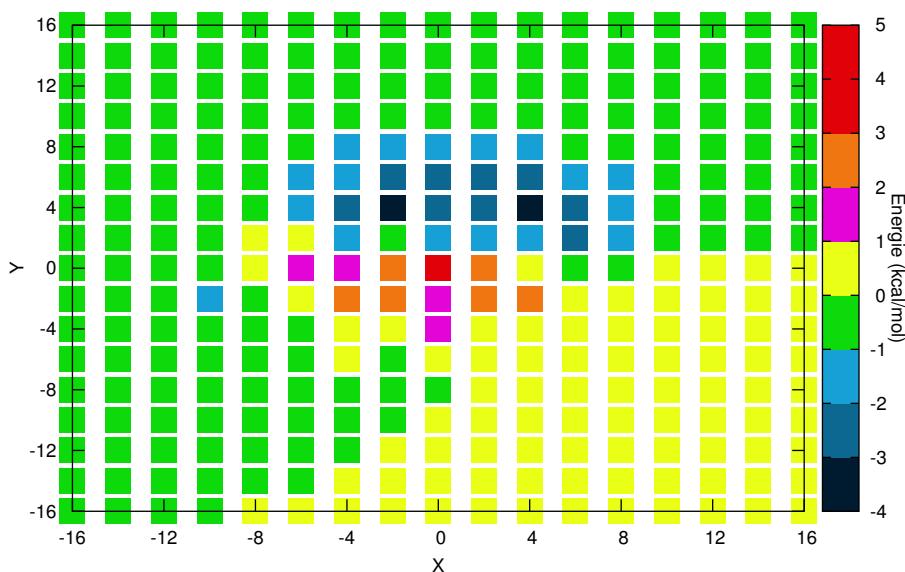
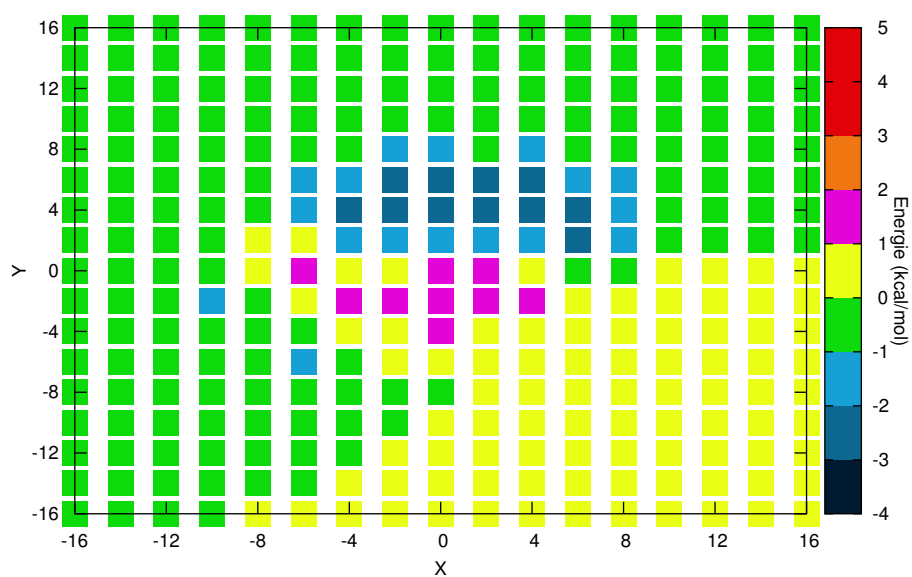
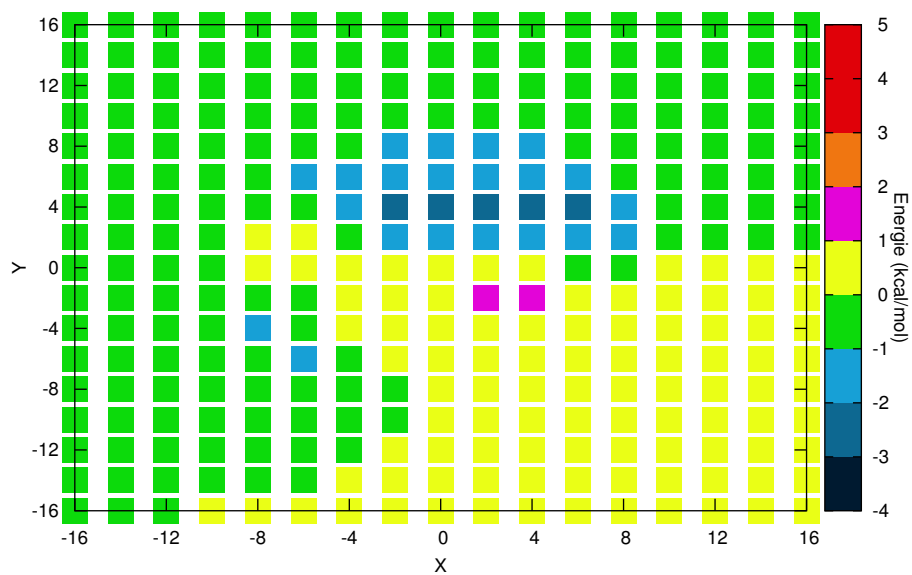
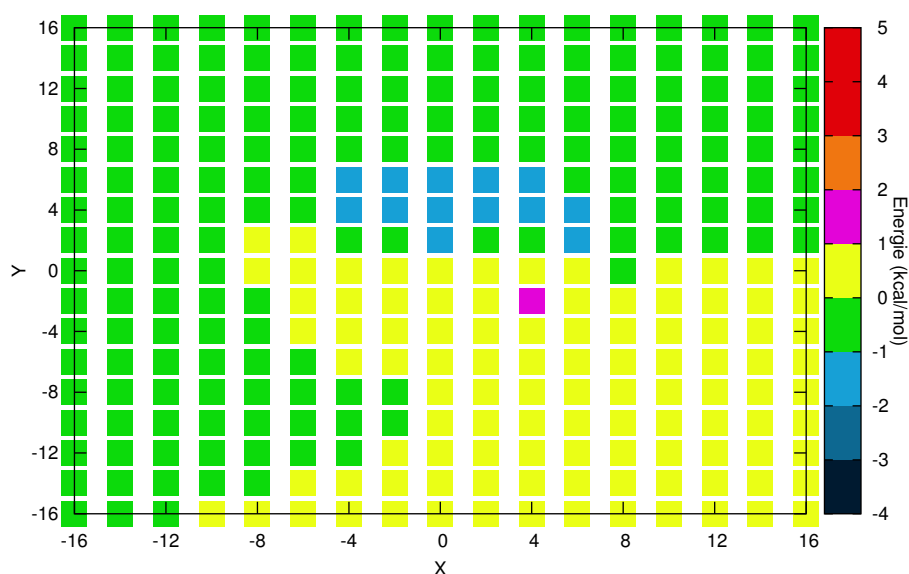
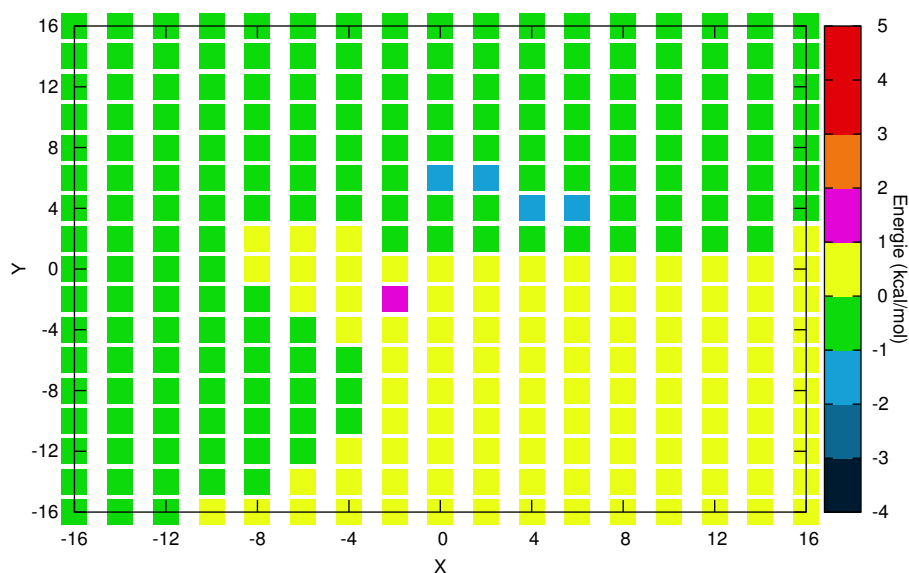


FIGURE 4.1: Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$

Les grilles des énergies d'interaction pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$, 3.8 \AA , 4.5 \AA et 5.5 \AA sont montrées dans les figures 4.2 à 4.5.

FIGURE 4.2: Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$ FIGURE 4.3: Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$

FIGURE 4.4: Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$ FIGURE 4.5: Energie d'interaction à l'état fondamental pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$

On voit que pour toutes les valeurs de z étudiées, la géométrie dans laquelle l'interaction entre le chromophore et la tyrosine est la plus favorable correspond à des positions décalées en x et en y positif, les positions précises des minima sont données dans le tableau 4.1.

4.1.2 Interaction entre le chromophore dans l'état S1 et un phénol

La figure 4.6 représente la grille des énergies d'interaction calculées avec la méthode CASPT2 pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que l'énergie d'interaction la plus attractive ($-4 \leq \Delta E \text{ (kcal/mol)} \leq -1$) est située dans la région où $2 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$, alors que la région répulsive (en jaune et rose dans la même figuree) se trouve pour x positif et y négatif. Il existe deux minima dans cette grille, obtenus pour $y = 4 \text{ \AA}$, $x = -2 \text{ \AA}$ et $y = 4 \text{ \AA}$, $x = 4 \text{ \AA}$, et l'énergie y est de l'ordre de -3.31 et -3.20 kcal/mol respectivement.

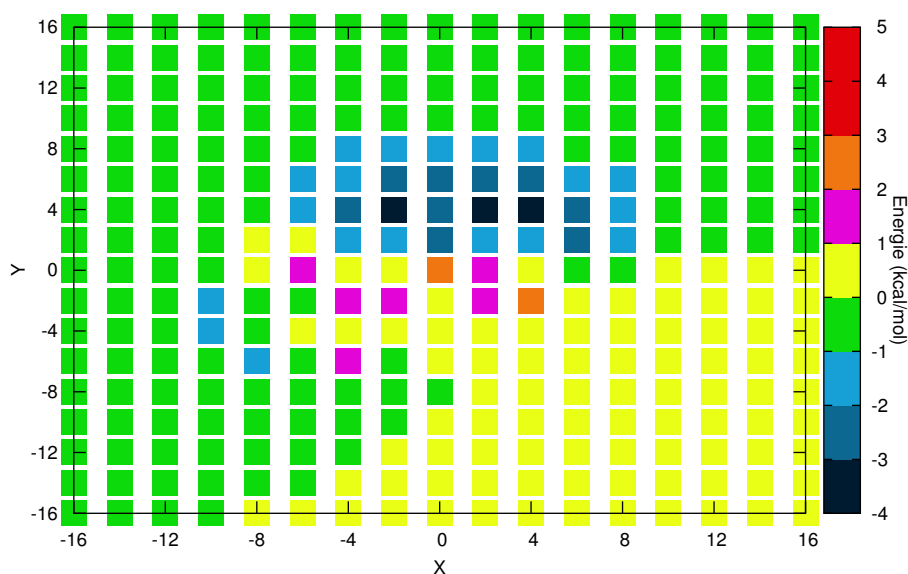
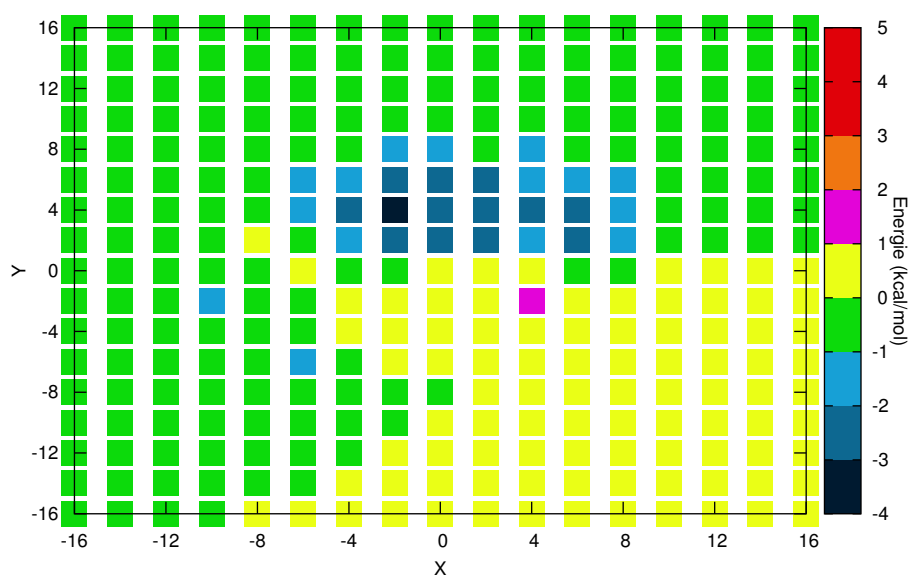
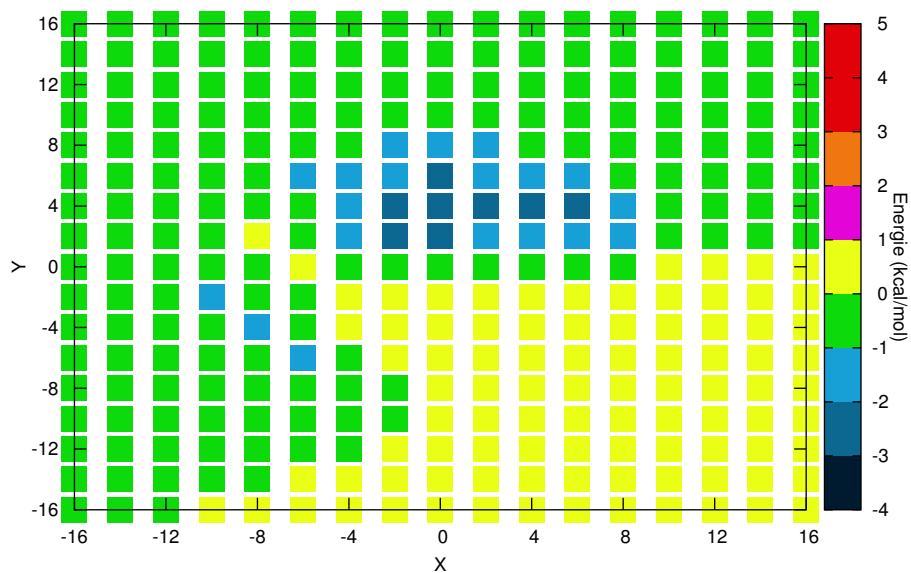
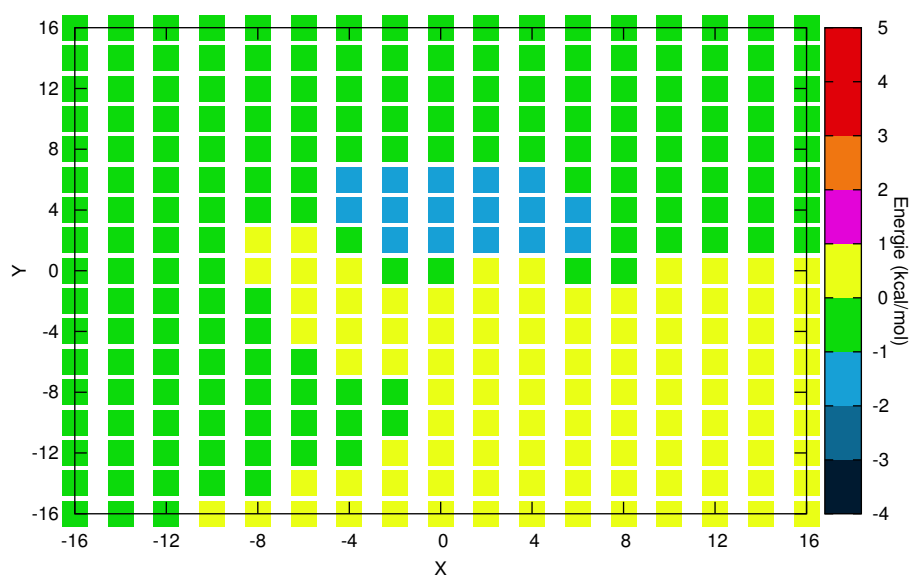
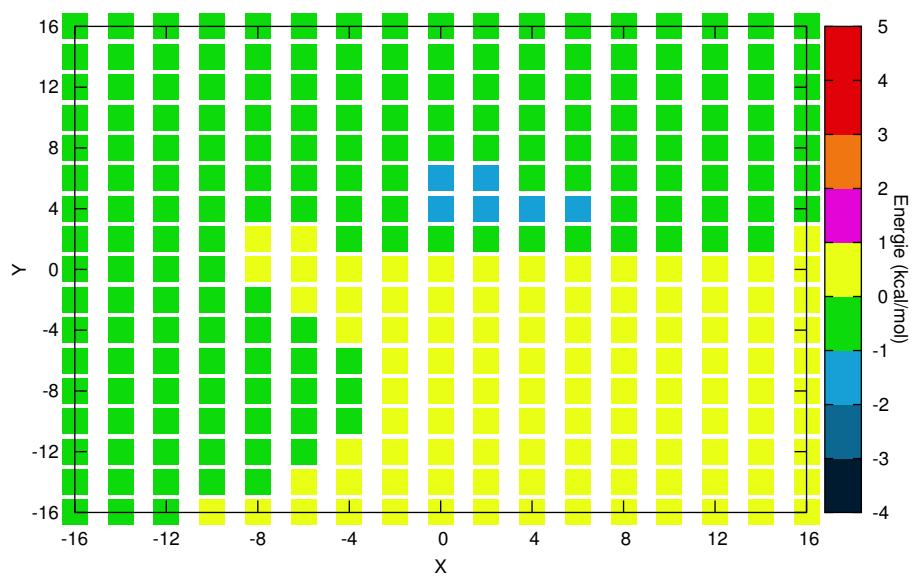


FIGURE 4.6: Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 3.3 \text{ \AA}$

Les grilles correspondantes aux autres valeurs de z sont données dans les figures 4.7 à 4.10

FIGURE 4.7: Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 3.5 \text{ \AA}$ FIGURE 4.8: Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 3.8 \text{ \AA}$

FIGURE 4.9: Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 4.5 \text{ \AA}$ FIGURE 4.10: Energie d'interaction à l'état excité pour $Z = 5.5 \text{ \AA}$

Les géométries les plus stables sont données dans le tableau 4.1.

4.1.3 Les géométries d'équilibre chromophore + phénol

D'après les résultats précédents, on peut établir un bilan des énergies minimales avec leurs géométries, qui est présenté dans le Tableau 4.1.

Z (Å)	Fondamental		Excité	
	(x,y)(Å)	$\Delta E_{min}(kcal/mol)$	(x,y)(Å)	$\Delta E_{min}(kcal/mol)$
3.3	-2.0 , 4.0	-3.06	-2.0 , 4.0	-3.31
	4.0 , 4.0	-2.96	2.0 , 4.0	-3.20
3.5	-2.0 , 4.0	-2.81	-2.0 , 4.0	-3.03
3.8	-2.0 , 4.0	-2.40	-2.0 , 4.0	-2.59
	0.0 , 4.0	-2.30	0.0 , 4.0	-2.55
	2.0 , 4.0	-2.41	2.0 , 4.0	-2.56
4.5	-2.0 , 4.0	-1.57	-2.0 , 4.0	-1.69
	0.0 , 4.0	-1.63	0.0 , 4.0	-1.78
	2.0 , 4.0	-1.66	2.0 , 4.0	-1.76
5.5	0.0 , 6.0	-1.05	-2.0 , 6.0	-0.99
	2.0 , 6.0	-1.08	0.0 , 6.0	-1.08
	4.0 , 4.0	-1.01	2.0 , 6.0	-1.10

TABLE 4.1: Bilan des énergies minimales par rapport à x et y, z étant fixé, du système chromophore (à l'état fondamental ou excité) + phénol

Dans ce tableau on voit que les valeurs de x et y où les interactions sont les plus favorables diffèrent très peu suivant que le chromophore est à l'état fondamental ou à l'état excité. On voit aussi qu'elles varient peu suivant les valeurs de z. On remarque que la géométrie reste approximativement dans la même région c'est-à-dire $x = -2$ Å et $y = 4$ Å. Elle est représentée dans la figure 4.11. On voit que le cycle phénol de la tyrosine est complètement décalé par rapport au phénolate du chromophore.

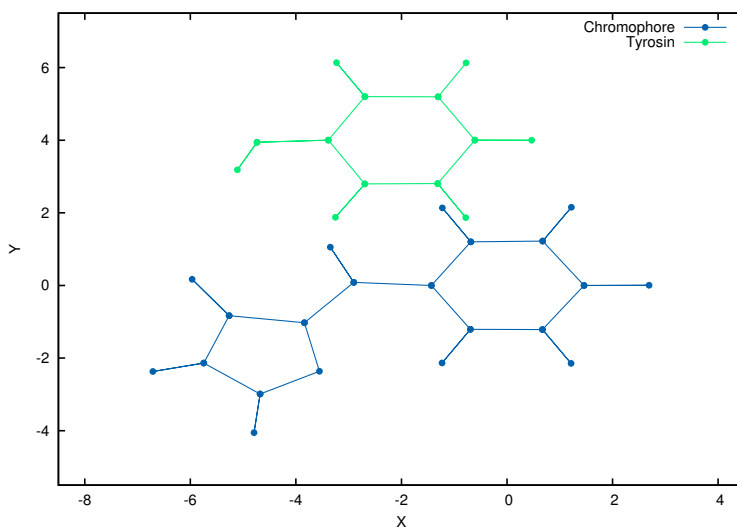


FIGURE 4.11: Géométrie d'équilibre d'énergie minimale

On note que les énergies d'interaction minimales sont plus négatives donc plus favorables à l'état excité qu'à l'état fondamental. Ceci provient certainement de la plus forte extension et de la polarisation du nuage électronique à l'état excité. Cette caractéristique pourrait avoir une influence sur la dynamique du chromophore à l'état excité en favorisant la géométrie plane fluorescente.

Nous allons maintenant regarder si les champs de force utilisés dans notre groupe rendent compte des résultats quantiques.

4.2 L'énergie d'interaction décrite par un champ de force

4.2.1 Caractéristique des champs de force utilisés

Dans le champ de force de Amber l'énergie est de la forme :

$$\begin{aligned}
 U = & \sum_{liaisons} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \\
 & + \sum_{\substack{angles \\ dièdres}} K_\beta [1 + \cos(n\beta - \gamma)] + \\
 & + \sum_{\substack{paires \\ non-liées}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} + \sum_{\substack{paires \\ non-liées}} \epsilon_m \left[\left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right]
 \end{aligned}$$

Le premier terme est l'énergie d'élongation des liaisons, le deuxième terme est l'énergie de déformation des angles de valence. Le troisième terme concerne les torsions autour des liaisons. Ces trois premiers termes sont souvent appelés "termes liés". Dans la dernière ligne, on trouve les termes d'interaction entre les atomes qui ne sont pas liés par une liaison chimique : l'énergie électrostatique et l'énergie de van der Waals. Ces deux termes sont souvent appelés "termes non liés".

Le champ de force dépend de nombreux paramètres : K_r , R_{eq} , K_θ etc qui sont différents suivant les atomes impliqués.

Dans le champ de force Amber il y a les paramètres pour tous les acides aminés standard à l'état fondamental. Le chromophore n'est pas un acide aminé standard et il faut définir des paramètres particuliers.

Pour les constantes de force K_r et K_θ des interactions liées et pour le terme de van der Waals, les auteurs [23] ont utilisé des paramètres de Amber correspondant à des situations analogues.

Pour les paramètres r_{eq} et θ_{eq} ils les ont pris dans les géométries optimisées par un calcul quantique, et ils sont donc un peu différents pour l'état fondamental et l'état excité. Les charges q_i ont aussi été obtenues à partir de calculs quantiques. On les calcule de façon à représenter le

mieux possible les valeurs du potentiel électrostatique créé par le chromophore sur une grille de points entourant le chromophore. Elles sont donc différentes pour l'état fondamental et pour l'état excité.

On ne trouve pas dans le champ de force Amber de paramètres satisfaisant pour les deux torsions autour des liaisons qui relient les deux cycles parce qu'on ne retrouve pas de situation analogue. Ils ont été déterminés à partir de calculs quantiques. Pour le chromophore à l'état fondamental, la forme ci-dessus est satisfaisante, mais elle ne convient pas pour le chromophore à l'état excité. En effet les auteurs ont montré qu'il fallait un couplage entre les deux torsions autour des deux liaisons entre le phénolate et l'imidazolinone. Ils ont déterminé ce potentiel à partir de calculs quantiques [3, 23]. Il comporte 30 termes qui sont des produits de sinus et cosinus des deux angles de torsion.

Dans les calculs de ce chapitre, le chromophore reste dans sa géométrie d'équilibre, seuls les termes d'interaction entre le chromophore et la tyrosine vont varier, c'est à dire les deux termes non liés.

4.2.2 Énergie d'interaction - Résultats.

Les résultats sont donnés dans les figures 4.12 4.13 4.14 4.15 4.16 pour l'état fondamental et les figures 4.17 4.18 4.19 4.20 4.21 pour l'état excité. Les géométries les plus stables sont données dans le tableau 4.2.

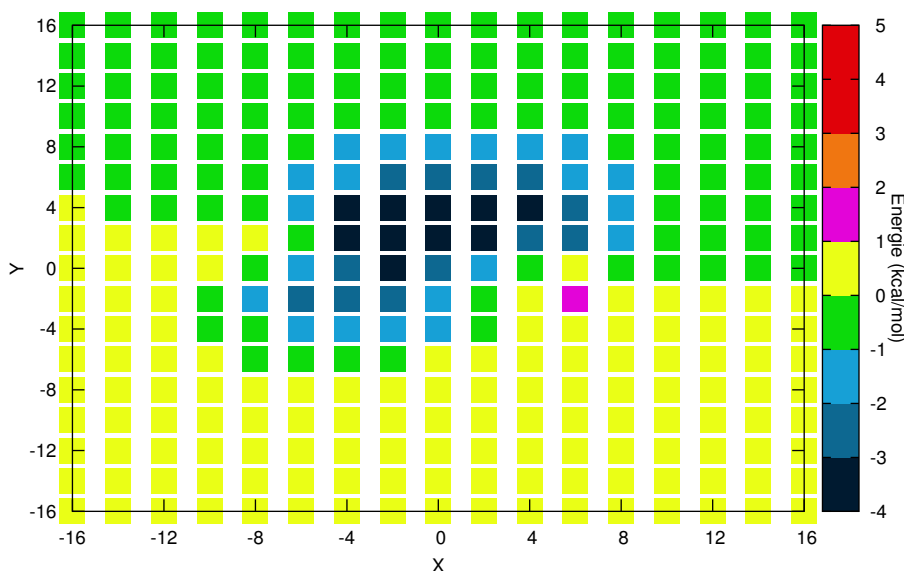


FIGURE 4.12: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$. On remarque dans cette grille que l'énergie d'interaction la plus attractive ($-5 \leq \Delta E \text{ (kcal/mol)} \leq -1$) est située dans la région où $-4 \leq y \leq 8 \text{ \AA}$ et $-6 \leq x \leq 8 \text{ \AA}$. Alors que la région répulsive est décalée vers y négatif. Le minimum se trouve dans la géométrie où $x = -2.0 \text{ \AA}$ et $y = 2.0 \text{ \AA}$ où l'énergie est de l'ordre de -4.73 kcal/mol .

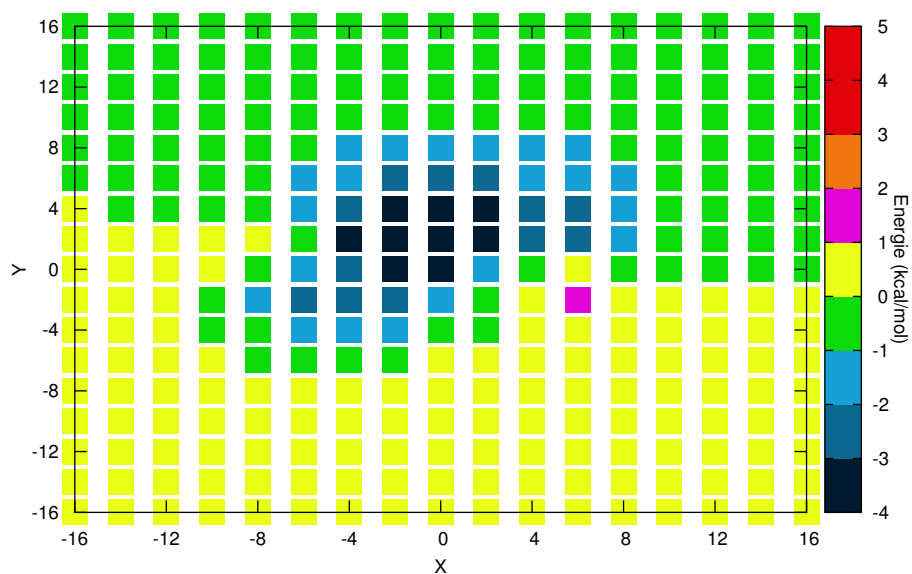


FIGURE 4.13: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$.

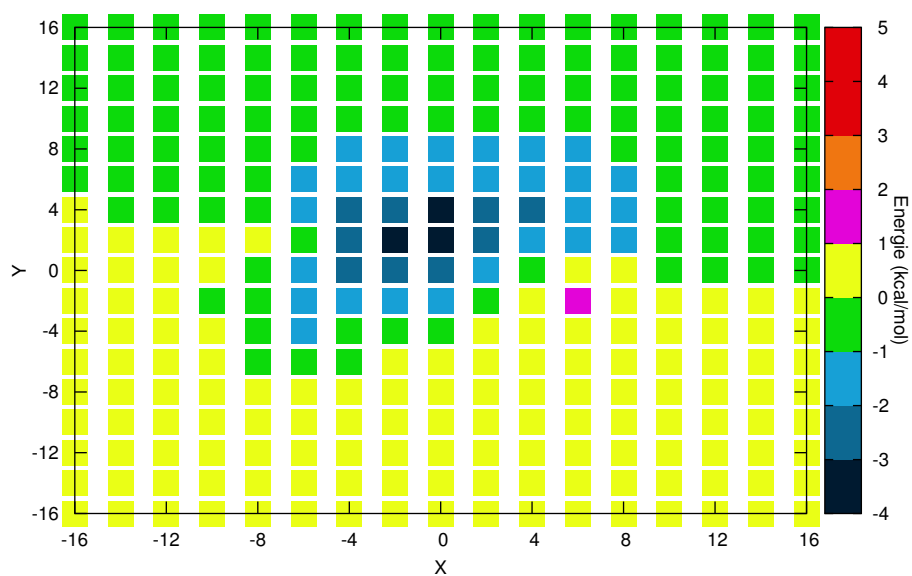


FIGURE 4.14: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$.

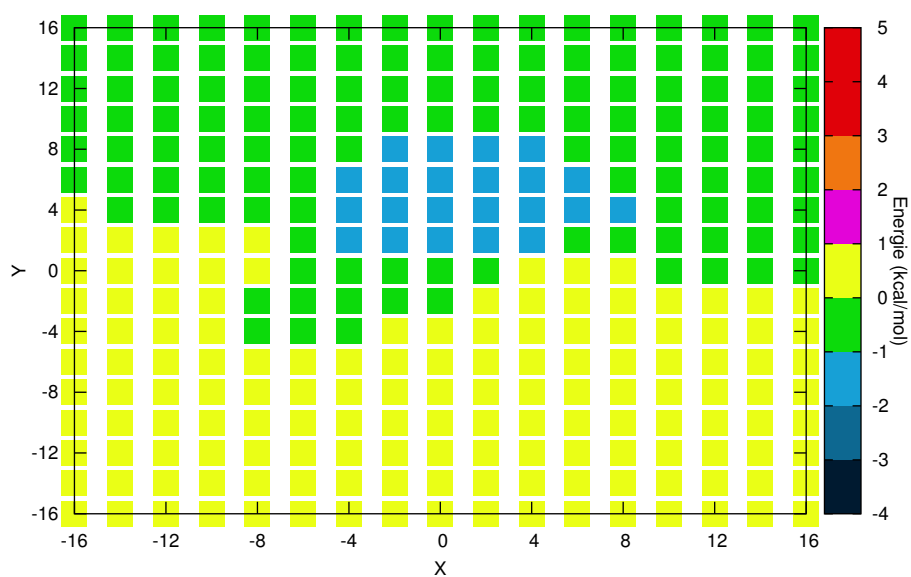


FIGURE 4.15: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$.

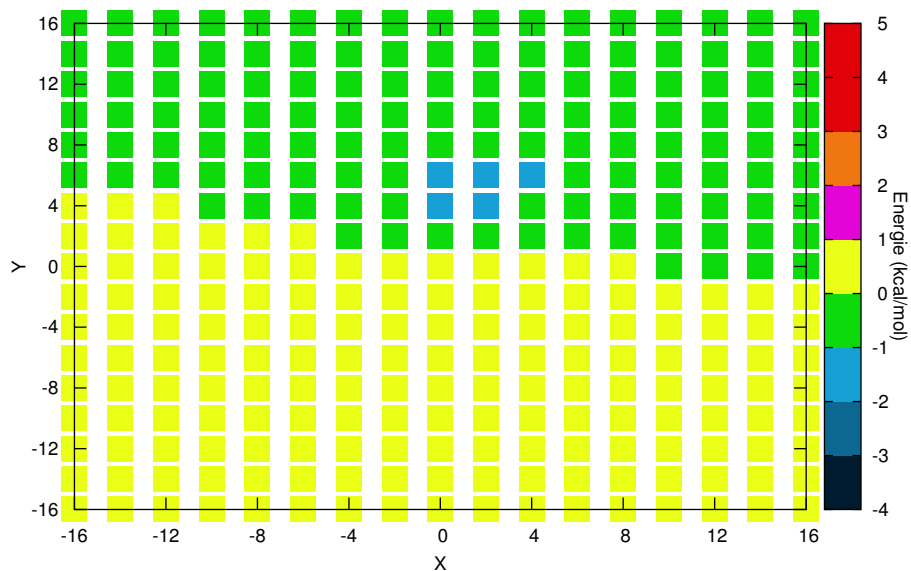


FIGURE 4.16: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force pour l'état fondamental pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$.

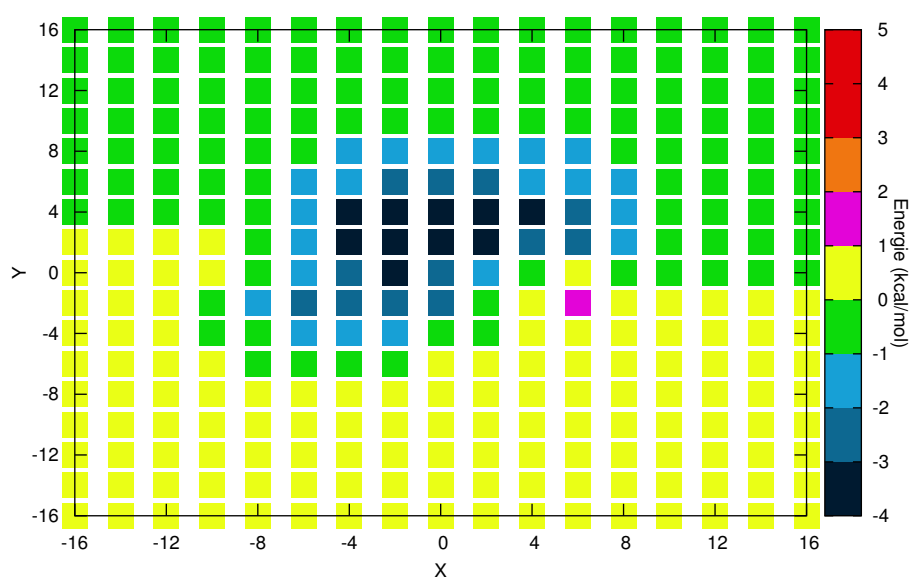


FIGURE 4.17: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.3 \text{ \AA}$.

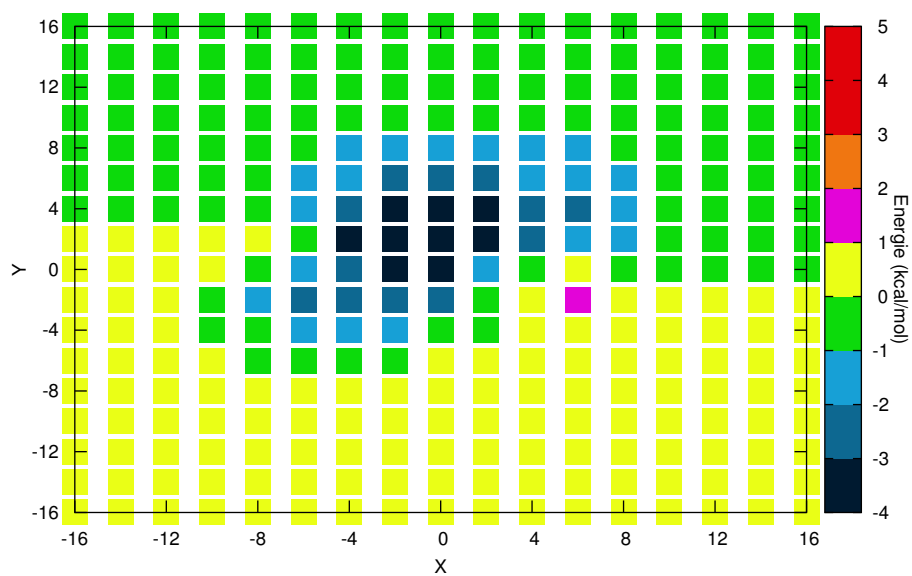


FIGURE 4.18: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.5 \text{ \AA}$.

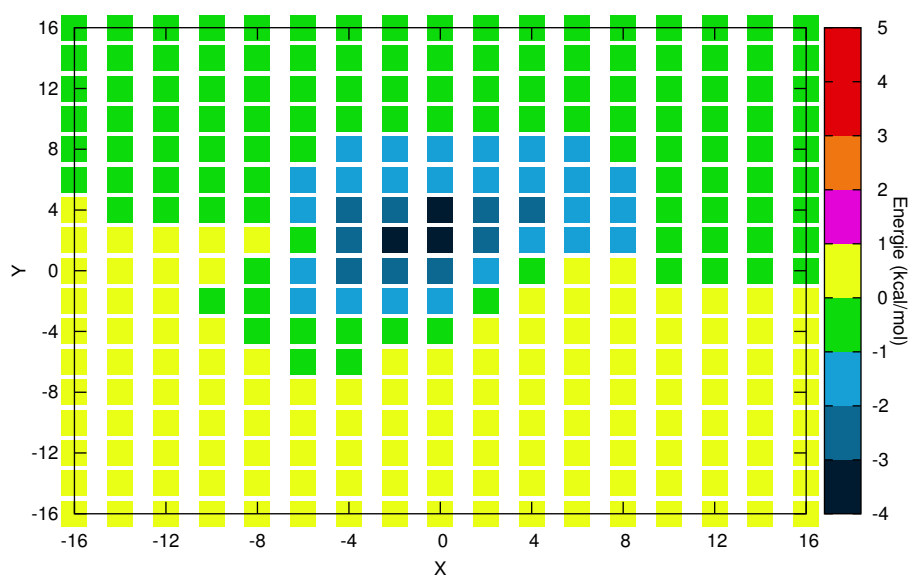


FIGURE 4.19: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 3.8 \text{ \AA}$.

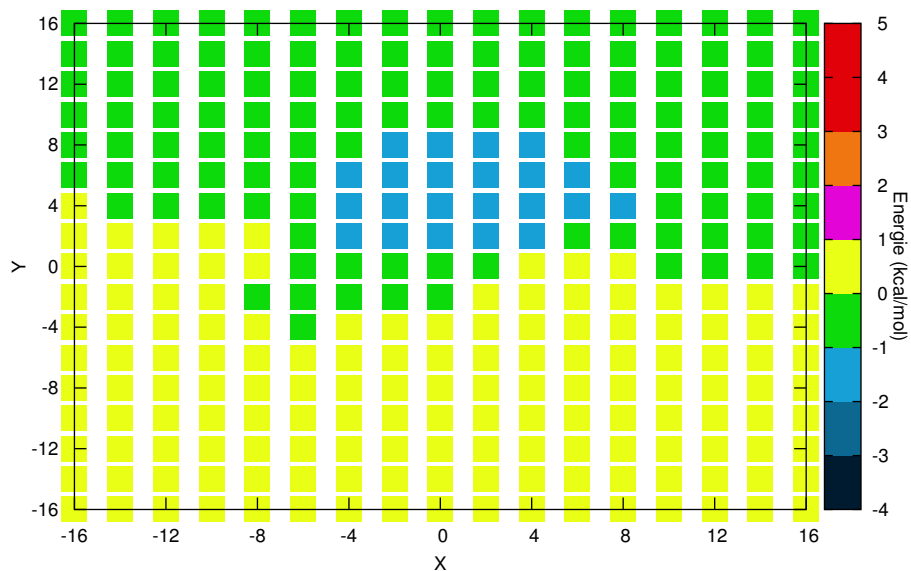


FIGURE 4.20: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 4.5 \text{ \AA}$.

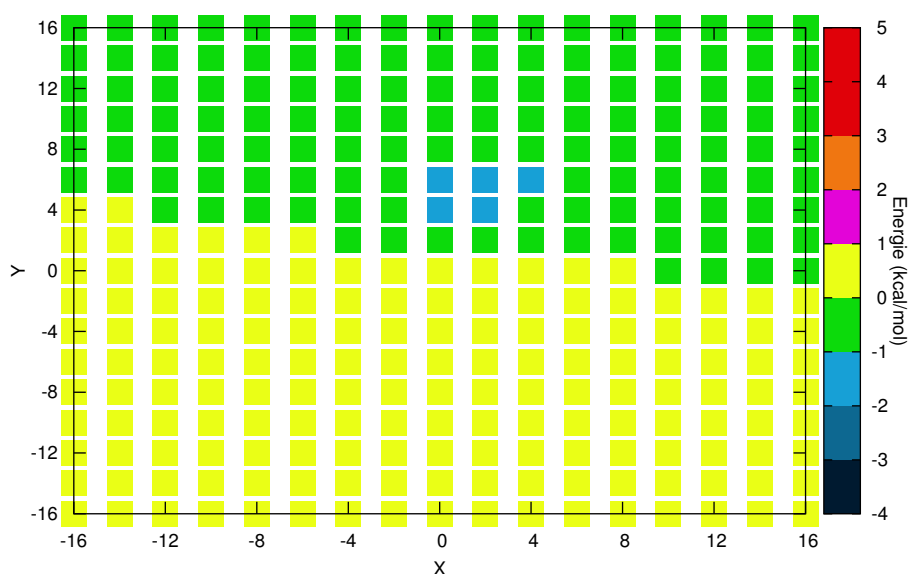


FIGURE 4.21: La grille des énergies d'interaction avec le potentiel du champ de force standard amber pour l'état excité pour la valeur $Z = 5.5 \text{ \AA}$.

D'après les résultats observés précédemment, on peut établir un bilan des énergies minimales avec leurs géométries :

	AMBER (S0)		AMBER (S1)	
$Z (\text{\AA})$	$(x,y)(\text{\AA})$	$\Delta E_{min}(\text{kcal/mol})$	$(x,y)(\text{\AA})$	$\Delta E_{min}(\text{kcal/mol})$
3.3	-2.0 , 2.0	-4.73	0.0 , 2.0	-4.58
3.5	-2.0 , 2.0	-4.35	0.0 , 2.0	-4.40
3.8	-2.0 , 2.0	-3.44	0.0 , 2.0	-3.58
4.5	0.0 , 4.0	-1.92	0.0 , 4.0	-1.95
5.5	0.0 , 4.0	-1.04	0.0 , 4.0	-1.06

TABLE 4.2: Bilan des énergies minimales dans le cas du chromophore à l'état fondamental S0 et à l'état excité S1, et des géométries associées

On note que les énergies sont de façon générale plus basses qu'avec les calculs quantiques CASPT2 4.1.

On voit que pour les trois valeurs les plus petites de z la géométrie d'équilibre de S1 est différente de celle de S0, avec le cycle phénol qui n'est pas décalé suivant x .

Avec le chromophore à l'état fondamental, si on compare avec les résultats obtenus par CASPT2, on voit que le décalage suivant y est plus faible. La géométrie d'équilibre obtenue avec le champ de force est présentée dans la figure 4.22

Dans le cas du chromophore à l'état S1, on observe aussi un décalage plus faible : la position d'équilibre par rapport à x et y , pour les faibles valeurs de z , passe de $x = -2 \text{ \AA}$, $y = 4 \text{ \AA}$ dans le cas de CASPT2 à $x = 0 \text{ \AA}$, $y = 2 \text{ \AA}$ dans le cas du champ de force.

:

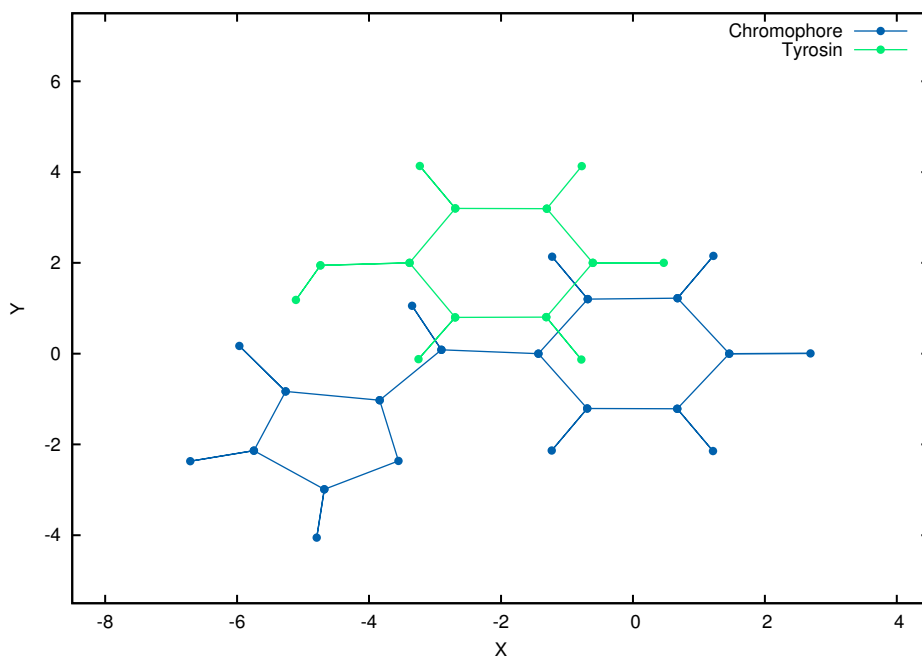


FIGURE 4.22: Géométrie d'équilibre pour le système chromophore à l'état fondamental + phénol obtenue avec le champ de force.

On retient deux résultats importants en comparant les tableaux 4.1 et 4.2. D'une part les description par un champ de force conduit à une superposition plus importante des deux molécules (valeurs absolues de x et y plus faibles) que par la description quantique. D'autre part, le champ de force surestime l'interaction stabilisante entre les deux composés aromatiques

4.3 Comparaison de CASPT2 avec le potentiel d'un champ de force

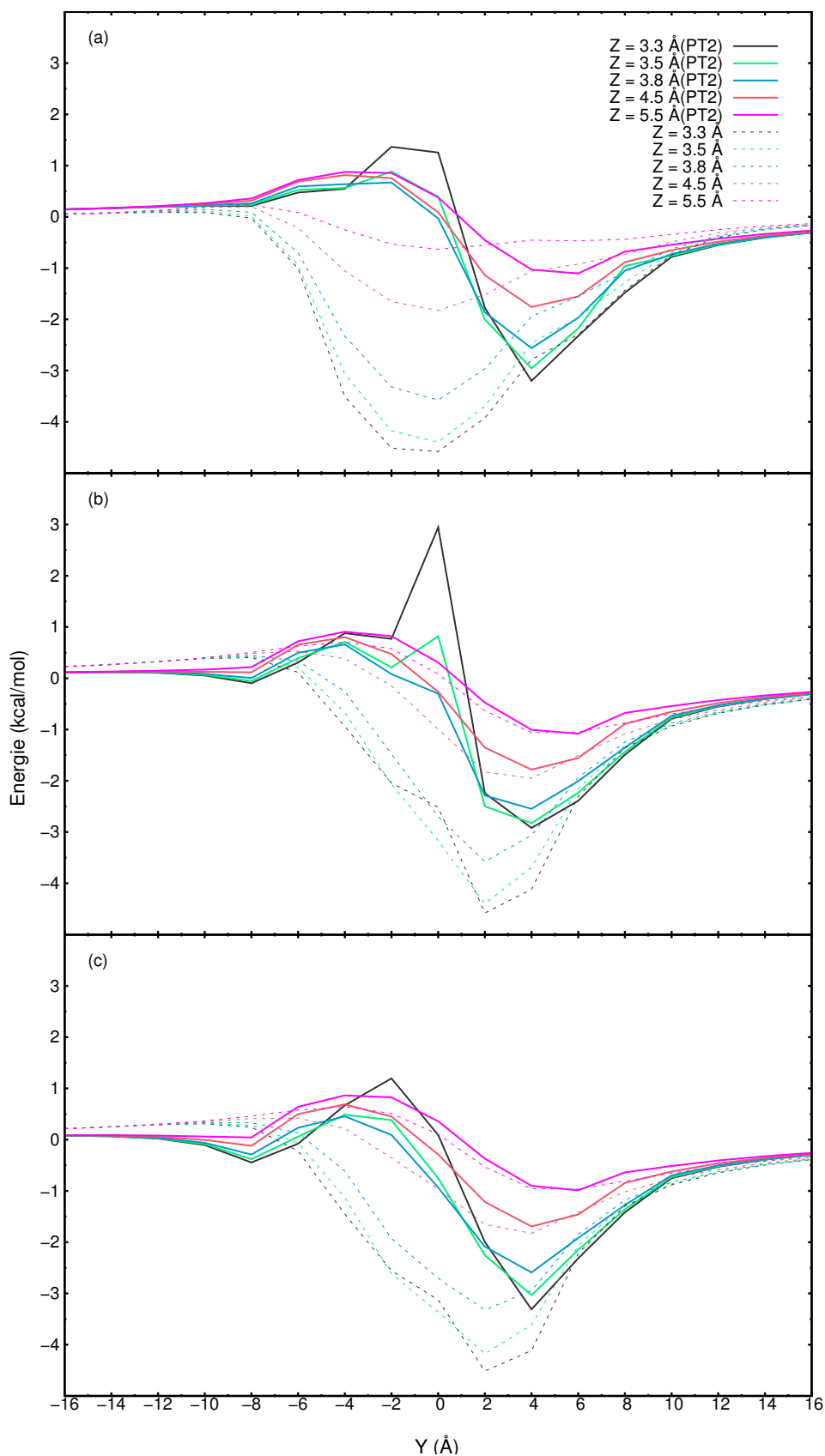


FIGURE 4.23: La variation de l'énergie d'interaction en fonction de y pour différentes distances Z : 3.3 Å , 3.5 Å , 3.8 Å , 4.5 Å et 5.5 Å . Avec : (a) $x = +2 \text{ Å}$, (b) $x = 0 \text{ Å}$, (c) $x = -2 \text{ Å}$. Les valeurs obtenues par CASPT2 sont en traits pleins, et celles obtenues par le champ de force sont en pointillés.

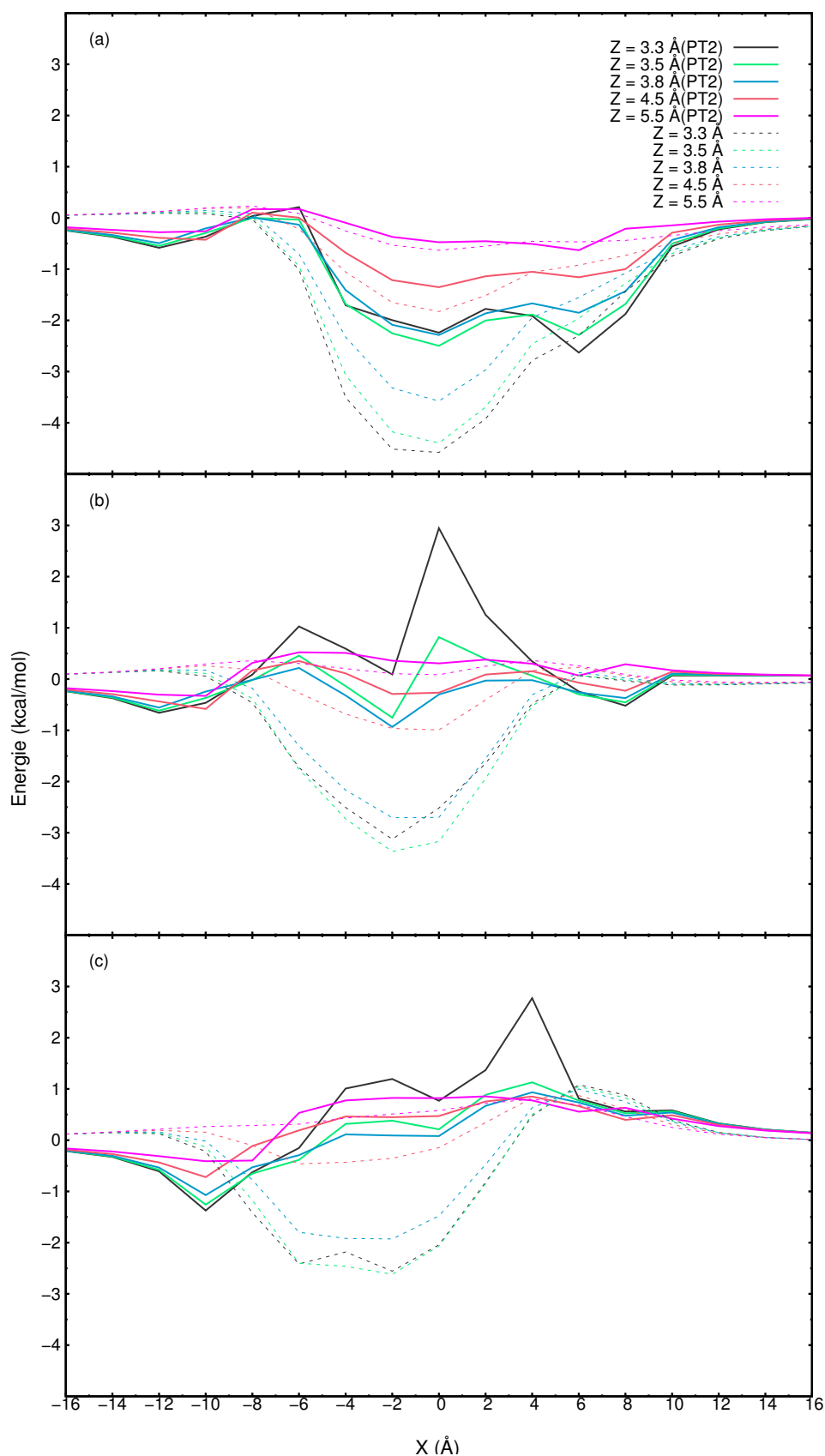


FIGURE 4.24: La variation de l'énergie d'interaction en fonction de x pour des déffirante distance Z : 3.3 Å, 3.5 Å, 3.8 Å, 4.5 Å et 5.5 Å. Avec : (a) $y = +2$ Å, (b) $y = 0$ Å, (c) $y = -2$ Å. Les valeurs obtenues par CASPT2 sont en traits pleins, et celles obtenues par le champ de force sont en pointillés.

Afin de faciliter la comparaison des deux méthodes de calculs pour l'état S1, nous reportons dans les figures 4.23 et 4.24 la variation de l'énergie d'interaction calculée de façon quantique ou à l'aide du champ de force en fonction de y pour x et z fixés ou en fonction de x pour y et z fixés.

Ces figures montrent que le champ de force AMBER surestime l'interaction stabilisante sur une large gamme de valeurs de x et y et ceci quelque soit la coordonnée z . Les géométries les plus stables avec le potentiel AMBER correspondent toujours à un recouvrement plus important des deux molécules. Dans les deux méthodes, l'énergie d'interaction devient négligeable pour des valeurs de x et y inférieurs à -12 \AA et supérieurs à 12 \AA .

Les énergies d'interaction et leurs variations en fonction de x , y et z sont donc significativement différentes entre le champ de force AMBER et les calculs quantiques CASPT2.

Il est donc possible que la mauvaise description de la dynamique du chromophore à l'état excité dans la YFP étudiée par simulation moléculaire au laboratoire, soit due à la mauvaise représentation des interactions chromophore (S1)- tyrosine par le champ de force utilisé.

4.4 Interpolation

On cherche à interpoler les énergies d'interaction à l'état excité (CASPT2) avec une expression analytique par type de paire d'atomes non-liés, en concordance avec celle du potentiel d'interaction du champ de force utilisé.

Les type d'atomes qu'on utilise sont : C (carbone), Hydrogène (H), azote (N) et l'oxygène. Chaque type d'atome est considéré comme identique dans les molécules sauf pour l'oxygène où on distingue deux type O et O- .

Dans un premier temps, on a modifié seulement les termes d'énergie d'interaction de van der Waals et on a gardé inchangées les charges des atomes :

$$f(k) = \sum_{ij} \left[a_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^6} + b_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^{12}} \right] \quad (4.2)$$

Où :

- k est l'indice du point calculé
- ij est le type de paire d'atomes
- pq : l'atome p appartient au chromophore et l'atome q appartient à la tyrosine.
- a_{ij} , b_{ij} sont les paramètres qu'on cherche à ajuster par la minimisation de l'erreur quadratique moyenne (RMS) :

$$\chi = \frac{1}{N} \sum_k [f(k) - E'(k)]^2 \quad (4.3)$$

Avec N le nombre des points calculés, E' est l'énergie CASPT2 moins l'énergie d'interaction électrostatique entre les charges .

Comme f dépend linéairement des inconnues a_{ij} et b_{ij} le problème peut être résolu sim-

plement.

Pour N égal à 1445 points on trouve un RMS de 0.83 kcal/mol ce qui fait que cette interpolation n'est pas optimale pour construire le nouveau champ de force. Si on augmente le nombre de points de la grille $N = 1805$ points (c'est à dire qu'en ajoutant notamment des points en $x = \pm 30$ Å et $y = \pm 30$ Å, où l'énergie d'interaction est nulle), on trouve un RMS de 0.75 kcal/mol, 0.08 kcal/mol plus petit que la valeur précédente. Les valeurs obtenues pour les coefficients a_{ij} et b_{ij} sont dans le tableau suivant :

Type de paire d'atomes ij	a_{ij}	b_{ij}
O- O	5.1898	-4.2642
O- C	-2.8420	-3.2172
O- H	4.1882	-3.7831
N O	-4.6698	3.9567
N C	-3.4195	3.5876
N H	-4.4821	3.9173
O O	-4.5203	3.7001
O C	-4.0369	3.6928
O H	3.7153	-3.3932
C C	-2.4231	3.0787
C H	1.9148	-2.9226
H H	3.0930	-2.9399

TABLE 4.3: Les coefficients a et b

On remarque que les signes des coefficients n'ont pas une signification physique, normalement on doit avoir un signe négatif pour l'ensemble des coefficients a_{ij} dont le terme associé représente la dispersion et positif pour les coefficients b_{ij} dont le terme associé représente la répulsion. Donc cette première approche n'est pas satisfaisante.

Dans un deuxième temps, nous avons laissé varier les charges et nous avons donc ajouté dans l'équation 4.2 les termes d'interactions électrostatiques. (Dans ce cas on interpole directement les énergies d'interaction CASPT2).

$$f(k) = \sum_{ij} \left[a_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^6} + b_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^{12}} + c_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}} \right] \quad (4.4)$$

Pour N égale à 1445 points on trouve un RMS de 0.192 kcal/mol, ce qui est meilleur que la valeur précédente obtenue. Si on augmente le nombre de point (1805 points) le RMS est de 0.174 kcal/mol soit une différence de kcal/mol 0.018 kcal/mol. Les coefficients obtenus pour a_{ij} , b_{ij} et c_{ij} sont dans le tableau suivant :

Type de paire d'atom ij	a_{ij}	b_{ij}	c_{ij}
O- O	-3.8020	3.4743	5.1472
O- C	-3.1378	-2.5046	6.4422
O- H	3.1680	-3.3337	-4.1204
N O	-4.3687	3.6365	22.8464
N C	-2.9002	3.0919	1.9696
N H	3.4044	-3.0877	-6.5393
O O	-4.5873	3.8241	16.2346
O C	-3.7520	3.5156	10.8309
O H	3.4906	-3.2383	-15.2892
C C	-3.2128	3.2946	4.2073
C H	3.1146	-3.0554	-6.8305
H H	-3.2692	3.1220	10.5506

TABLE 4.4: Les coefficients a , b et c

A nouveau les signes des coefficients a_{ij} et b_{ij} ne permettent pas de leur donner un sens physique. Les coefficients c_{ij} semblent avoir des signes corrects, mais ils sont beaucoup trop grands en valeur absolue.

Pour le troisième essai, dans l'équation 4.4 on ajoute un terme en $\frac{1}{r^2}$ qui représente l'interaction charge-dipole :

$$f(k) = \sum_{ij} \left[a_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^6} + b_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^{12}} + c_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}} + d_{ij} \sum_{pq} \frac{1}{r_{pq}^2} \right] \quad (4.5)$$

Pour N égal à 1445 points le RMS vaut 0.17 kcal/mol. Si on augmente le nombre de point (1805 points) on trouve un RMS de 0.156 kcal/mol. Les coefficients obtenus pour a_{ij} , b_{ij} , c_{ij} et d_{ij} sont dans le tableau suivant :

Type de paire d'atom ij	a_{ij}	b_{ij}	c_{ij}	d_{ij}
O- O	5.6534	-4.0243	-29.0643	311.8253
O- C	-3.0718	-2.9881	4.3285	-2.4128
O- H	3.9343	-3.5379	-6.7032	9.6872
N O	4.0707	-3.4573	-12.3270	64.1442
N C	3.1721	-2.4726	-6.8787	19.4057
N H	-3.3539	3.1352	9.0293	-35.9787
O O	-4.3443	3.6526	8.1920	-20.8224
O C	3.2404	3.2024	-9.2388	40.4899
O H	3.0917	-3.2357	6.3236	-29.5124
C C	-2.9955	3.2936	-3.8968	10.3120
C H	-3.3602	2.9688	8.1572	-32.3507
H H	3.3831	-2.9288	-9.9973	51.2505

TABLE 4.5: Les coefficients a , b , c et d

En considérant les 4 types de termes, l'interpolation peut être considérée numériquement correcte puisque le RMS est environ 30 fois plus petit que l'énergie d'interaction minimale. Cependant, les signes des coefficients ne sont pas tous adaptés à la nature physique du terme correspondant.

Une piste pour améliorer la situation serait d'introduire un terme en $\frac{1}{r^4}$ pour tenir compte de la polarisation, bien que la détermination des paramètres soit alors plus difficile.

Plusieurs aspects quantitatifs des résultats exposés dans les paragraphes 1, 2 et 3 de ce chapitre nous permettent de discuter le rôle que peut avoir l'amélioration du champ de force dans la simulation.

La tyrosine 203 a d'autres interactions avec son environnement dans la YFP, qui sont principalement des liaisons hydrogène.

Dans les simulations faites par le groupe, le groupement OH de Tyr203 a deux liaisons hydrogène (LH), avec une glutamine (Gln69) et avec une molécule d'eau (W). Ces deux LH font partie d'une chaîne de LH partant de l'atome O2 du chromophore et arrivant à N2 du chromophore : O2-Gln69-Tyr203-W-Glu222-N2.

Si on arrive à déterminer un champ de force représentant exactement l'énergie d'interaction de π -stacking CASPT2 pour l'état S1, et qu'on fait une simulation avec ce champ de force, la tyrosine aura tendance à se déplacer de la position d'équilibre du champ de force actuel ($x=0$ Å, $y=2$ Å) vers la position d'équilibre CASPT2 ($x=-2$ Å et $y=+4$ Å). C'est un grand déplacement qui impliquerait certainement de casser au moins une des LH.

On peut comparer les énergies mises en jeu. L'ordre de grandeur de la déstabilisation due à la rupture d'une LH est de l'ordre de 2 kcal/mol à 4 kcal/mol. Si on regarde la figure 4.6, qui donne les énergies d'interaction CASPT2 pour l'état S1 et pour $Z=3.3$ Å, on voit que le déplacement qu'on vient de décrire aboutit à une stabilisation due à l'amélioration de l'interaction de π -stacking d'environ 1 à 2 kcal/mol, qui ne compense pas la rupture d'une liaison hydrogène.

On peut donc douter que l'amélioration du champ de force de π -stacking conduise à une modification significative des positions relatives du chromophore et de la tyrosine dans la simulation, et donc cela ne devrait pas modifier les temps caractéristiques de torsion du chromophore conduisant à la désactivation non radiative.

Chapitre 5

Méthode directe de simulation du déclin de fluorescence

Nous revenons maintenant sur les calculs effectués par notre groupe sur la dynamique du chromophore à l'état excité S_1 dans la GFP et dans la YFP et sur la façon dont ils en ont déduit une constante de vitesse non radiative [3, 23].

Les simulations ont été faites sur le système formé par la protéine solvatée dans une boîte de molécules d'eau, ce qui fait de l'ordre de 25 000 atomes. Le champ de force utilisé a été décrit ici dans le chapitre 4, paragraphe 4.2.1. Cette fois-ci tous les termes du champ de force varient.

Pour chacune des deux protéines, ils ont effectué une simulation avec le chromophore à l'état S_0 et ils ont enregistré des géométries à intervalles de temps réguliers. Ce sont des "snapshots".

Puis ils ont effectué des simulations avec le chromophore à l'état S_1 en prenant comme points de départ des snapshots obtenus à l'état fondamental.

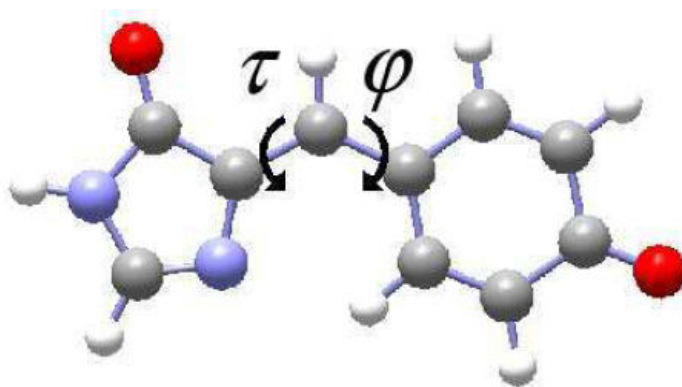


FIGURE 5.1: La définition des angles de torsion τ et φ

On rappelle que les grandeurs qui sont importantes pour le déclin non radiatif sont les angles φ et τ (figure 5.1). En effet les forces internes du chromophore à l'état S_1 agissent de façon à le faire tourner suivant l'un ou l'autre de ces angles, et les géométries atteintes quand l'un des deux est proche de 90° en valeur absolue sont telles qu'une conversion interne vers l'état

S_0 peut avoir lieu.

Pour chaque simulation ils ont tracé les fonctions $\varphi(t)$ et $\tau(t)$.

Un exemple de comment varient ces fonctions est montré dans la figure 5.2. Dans ce cas ils en déduisaient qu'il y avait une torsion suivant τ qui se produisait à 1.5 ns et que le chromophore subissait une désactivation non radiative à 1.5 ns. En déterminant ce temps pour un ensemble de simulations, ils en ont déduit un temps moyen de désactivation non radiative τ_{nr} qu'ils comparaient avec la valeur déduite des valeurs expérimentales de la durée de vie de fluorescence et du rendement quantique par la formule

$\tau_{nr} = \tau / (1 - \phi)$ (dans cette formule τ est le temps de vie de fluorescence et ϕ le rendement quantique).

Cette façon de faire aboutissait à un bon résultat dans le cas de la GFP, mais pas dans le cas de la YFP où ils obtenaient une valeur de 3.5 ns pour τ_{nr} , presque 3 fois plus petite que la valeur obtenue à partir des résultats expérimentaux (9.4 ns).

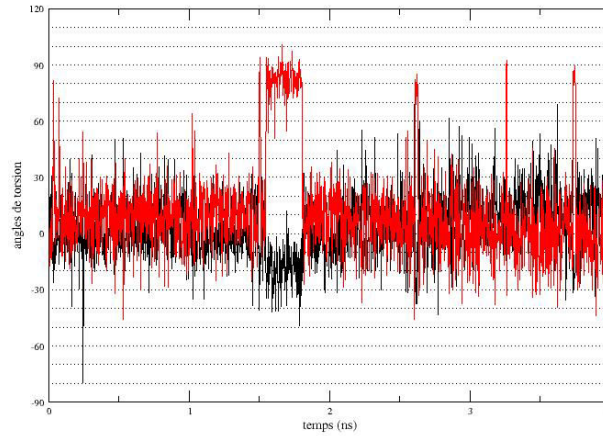


FIGURE 5.2: Variation des angles φ (en noir) et τ (en rouge) exprimés en degrés au cours d'une des simulations de la YFP avec le chromophore à l'état S_1 .

On présente maintenant une méthode directe permettant d'évaluer par simulation le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence.

5.1 Méthode

On part ici d'une équation différentielle semblable à l'équation habituelle pour le déclin de la population $S_1(t)$ d'un état excité qui peut revenir à l'état fondamental par un processus radiatif ou par un processus non radiatif. Mais on tient compte du fait que les probabilités de ces deux processus peuvent dépendre de la géométrie du système (c'est le cas pour le chromophore des protéines fluorescentes) et donc du temps. On écrit :

$$dS_1(t)/dt = -p_s(t)S_1(t)$$

où $p_s(t)$ est une densité temporelle de probabilité. Elle dépend du temps et c'est pour cela qu'on n'utilise pas le terme habituel « constante de vitesse ». Elle est la somme de la densité temporelle de probabilité du processus radiatif, $p_r(t)$, et de la densité temporelle de probabilité du processus non radiatif $p_{nr}(t)$:

$$p_s(t) = p_r(t) + p_{nr}(t)$$

En intégrant, on obtient :

$$S_1(t) = S_1(0) \exp \int_0^t -p_s(t') dt'$$

Supposons qu'on connaisse les fonctions $p_r(t)$ et $p_{nr}(t)$ en fonction des angles τ et φ du chromophore. Supposons qu'on a fait une dynamique moléculaire de la protéine et qu'on a enregistré les géométries instantanées (« snapshots ») tous les intervalles de temps Δt suffisamment petits. Soit k l'indice d'un snapshot. Pour ce snapshot on connaît les valeurs de τ et φ , donc les valeurs prises par p_r et p_{nr} . On peut écrire :

$$S_1(k+1) = S_1(k) - p_s(k) \Delta t S_1(k)$$

et intégrer numériquement pas à pas la fonction $S_1(k)$.

En fait, dans la suite de ce chapitre, après avoir étudié comment varient les probabilités, on verra qu'on peut étudier le système sans intégrer l'équation.

5.2 Probabilité de conversion non radiative

Il y a conversion non radiative entre deux états adiabatiques (c'est à dire qui diagonalisent l'hamiltonien électronique) ψ_k et ψ_l si l'élément de matrice de l'opérateur de dérivation par rapport aux coordonnées des noyaux $\langle \psi_k, \nabla \psi_l \rangle$ est suffisamment grand par rapport à la différence entre les deux énergies. Cela se produit en général dans des zones limitées. On repère ces zones en combinant ψ_k et ψ_l de façon à obtenir une représentation "quasi-diabatique" (des états "quasi-diabatiques" sont des états dont la structure électronique varie peu dans le domaine considéré, l'élément de matrice de l'opérateur de dérivation par rapport aux coordonnées des noyaux entre ces états est très petit) : il y a conversion non radiative si la différence entre les énergies des deux fonctions d'ondes quasi-diabatiques $\psi_k^{(diab)}$ et $\psi_l^{(diab)}$ est inférieure à l'élément de matrice non diagonal de l'hamiltonien entre ces deux fonctions d'ondes.

Dans le cas du chromophore anionique les fonctions $\psi_k^{(diab)}$ et $\psi_l^{(diab)}$ ont été déterminées en utilisant une méthode de projection définie à partir d'états *ad hoc* [65, 66] et en utilisant l'hamiltonien effectif de Olsen et Mc Kenzie[60]

Les résultats sont présentés sur la figure 5.3

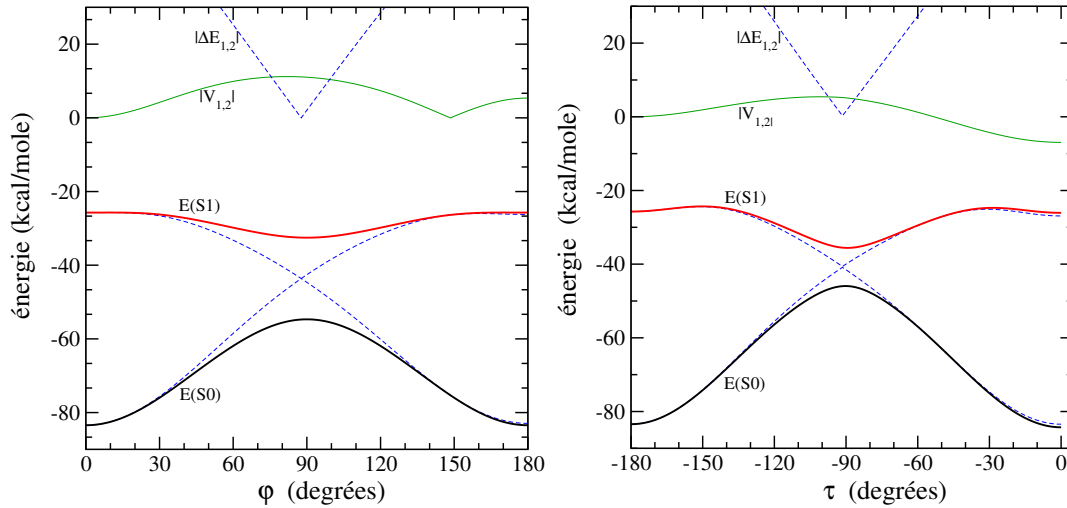


FIGURE 5.3: Coupes des surfaces d'énergies potentielle adiabatiques et quasi-diabatiques du chromophore : à gauche coupe suivant φ à τ constant ($=0$) et à droite, coupe suivant τ à φ constant ($=0$).

- lignes pleines rouges et bleu : énergies adiabatiques ;
- tirets bleu : énergies quasi-diabatiques et module de la différence de ces énergies ;
- ligne pleine verte : élément de matrice non diagonal de l'hamiltonien effectif entre les deux états quasi-diabatiques.

On voit que la conversion non radiative peut se produire seulement tout près des points $\varphi = 0$, $|\tau| = 90^\circ$ ou $|\varphi| = 90^\circ$, $\tau = 0$. On utilisera ici une probabilité constante (à déterminer empiriquement) dans un cercle de rayon égal à 20° autour de ces points et une probabilité nulle en dehors.

5.3 Probabilité de conversion radiative

5.3.1 Expression théorique

La théorie de base permettant de prédire la probabilité de conversion radiative, c'est-à-dire de fluorescence, dérive de celle du "corps noir" .[67, 68, 69, 70]

Le "corps noir" est un solide qui n'absorbe pas la lumière (mais qui peut échanger de l'énergie avec elle) et qui est en équilibre thermique avec elle ; c'est un système idéal qui vise initialement à décrire le fait qu'un objet matériel chauffé à une température suffisante émet de la lumière rouge, puis blanche ... Il se trouve que les résultats obtenus permettent aussi de prédire l'intensité de fluorescence de systèmes tels que le chromophore considéré ici. L'analyse comporte 3 étapes numérotées 0, 1 et 2 : analyse du système de photons, puis de l'équilibre matière-photons, puis de l'effet des photons sur les atomes.

- *étape 0.1.* Nombre d'états stationnaires à une fréquence donnée. On considère ici que les photons sont représentés par des ondes à l'intérieur de la boîte constituée par le "corps

noir". Si ces ondes sont stationnaires, elles ne peuvent avoir que certaines longueur d'ondes. En une dimension, les longueur d'ondes possibles sont telles que $n\lambda/2 = X$ (X = dimension de la boîte). Le nombre de fréquences possibles inférieures à une fréquence donnée ν est alors égal à $n = 2X/\lambda = 2X\nu/c$; donc, en 3D : $n = 8V\nu^3/c^3$. Le nombre de degrés de liberté au voisinage d'une fréquence donnée ν est donc égal à :

$$dn = \Lambda V \frac{\nu^2}{c^3} d\nu \quad (5.1)$$

où Λ est une constante sans dimension qui comporte le facteur 3 venant de la différentiation de ν^3 et un facteur dépendant de la forme du solide, mais pas de la fréquence.

▪ *étape 0.2.* Distribution d'énergie des photons de fréquence donnée. Les différentes fréquences possibles pour les ondes stationnaire sont considérées ici comme des degrés de liberté. Il peut y avoir plus ou moins d'énergie sur chacun. Pour un système à l'équilibre à la température T , la distribution d'énergie sur chaque degré de liberté est en $N \exp(-\beta E)$ (avec $\beta = 1/kT$, N constante de normalisation qui est l'inverse de la fonction de partition)[67]. L'hypothèse essentielle[69] est que, pour une onde lumineuse de fréquence ν , les seules énergies possibles sont des multiples entiers de $h\nu$ soit $kh\nu$ où h est une constante *ad hoc* (ou "constante de Planck) et k un entier. L'expression de Boltzmann, $N \exp(-\beta E)$, donne donc la distribution des k et on peut trouver la valeur moyenne de l'énergie sur un degré de liberté donné en sommant $N E \exp(-E/kT)$ sur toutes les valeurs possibles de k avec ν constant. On trouve

$$\langle E_\nu \rangle = \frac{\sum_{k=0,\infty} kh\nu \exp(-\beta kh\nu)}{\sum_{k=0,\infty} \exp(-\beta kh\nu)} = \frac{h\nu}{\exp(\beta h\nu) - 1} \quad (5.2)$$

On note que pour $h\nu \ll kT$, donc $\beta h\nu \ll 1$, on a $\langle E_\nu \rangle = kT$ comme en thermodynamique classique. Pour les plus hautes fréquences, la loi est différente.

▪ *étape 0.3.* Energie moyenne des photons de fréquence donnée en équilibre avec le corps noir : elle est égale à $\langle E_\nu \rangle$, eq.(5.2), multipliée par la densité des ondes de fréquence ν dans le corps noir, eq.(5.1). D'où la densité d'énergie par unité de volume et de fréquence (loi de Plank)

$$\rho(\nu) = \frac{d^2 E}{dV d\nu} = \frac{\Lambda}{c^3} \frac{h\nu^3}{\exp(\beta h\nu) - 1} \quad (5.3)$$

▪ *étape 1.0.* On fait intervenir la matière du corps noir. Ici l'hypothèse essentielle (Einstein, 1905) est que chaque atome interagit avec la lumière de trois façons différentes : absorption stimulée, émission stimulée et émission spontanée (ou fluorescence). Dans chaque cas il y a transition de l'atome entre deux états. Soit E_1 et E_2 les énergies de ces deux états et ν la fréquence de l'onde lumineuse avec $\nu = (E_2 - E_1)/h$, alors le nombre de transitions par

seconde est

$$\text{transitions } 1 \rightarrow 2 : N_1 B_{12} \rho(\nu)$$

$$\text{transitions } 2 \rightarrow 1 : N_2 [A_{21} + B_{21} \rho(\nu)]$$

où A_{21} , B_{21} et B_{12} sont des coefficients caractéristiques des atomes (coefficients d'Einstein), $\rho(\nu)$ est la densité d'énergie de photons, eq.(5.3) et N_1 et N_2 sont les nombres d'atomes initialement (avant transition) dans les états 1 et 2. Les coefficients B_{12} et B_{21} sont relatifs à l'absorption et à l'émission stimulée, le coefficient est relatif à l'émission spontanée (la fluorescence).

• *étape 1.1.* A l'équilibre, le bilan des échanges d'énergie entre les atomes (constituant le "corps noir") et les ondes lumineuses doit être nul (pas d'échange d'énergie) ce qui implique

$$N_1 B_{12} \rho(\nu) = N_2 (A_{21} + B_{21} \rho(\nu))$$

Or, les N_1 et N_2 sont reliés par la distribution de Boltzmann :

$$\frac{N_2}{N_1} = \exp[-\beta(E_2 - E_1)] = \exp(-\beta h\nu)$$

et $\rho(\nu)$ par la loi de Planck, eq.(5.3). On en déduit

$$A_{21} [\exp(\beta h\nu) - 1] + B_{21} \Lambda \nu^3 = B_{12} \frac{\Lambda}{c^3} \nu^3 \exp(\beta h\nu)$$

étape 1.2. Les coefficients A_{21} , B_{21} et B_{12} sont des propriétés atomiques indépendantes de la présence ou non d'un équilibre avec le corps noir. Le fait qu'on puisse avoir équilibre avec un corps noir à toute température impose une relation entre ces coefficients. On trouve deux relations exprimant l'égalité des termes en $\exp(\beta h\nu)$ d'une part et des termes sans $\exp(\beta h\nu)$ d'autre part ; d'où (lois de Einstein) :

$$A_{21} = B_{21} \Lambda \nu^3 \quad B_{21} = B_{12} \tag{5.4}$$

• *étape 2.0.* Probabilité d'absorption stimulée. On étudie ici le coefficient B_{12} . On suppose que l'on connaît les niveaux d'énergies E_1 et E_2 et les fonctions d'ondes correspondantes ψ_1 et ψ_2 des atomes/molécules constituant le corps noir. Pour déterminer la probabilité de transition, on représente les ondes lumineuses par un champ électrostatique oscillant à la fréquence ν avec une amplitude \mathcal{E} et uniforme dans le domaine spatial des atomes/molécules considérées et on évalue leur effet par la théorie des perturbation dépendant du temps[71]. Elle montre que l'effet de l'onde lumineuse est de faire passer le système de l'état initial d'énergie E_1 à l'état final d'énergie E_2 avec une probabilité dépendant du temps

$$P_{12}(t) = \frac{1}{\hbar^2} \left| \int_0^t \exp(2i\pi\nu t') W_{12}(t') dt' \right|^2 \tag{5.5}$$

où W_{12} est l'élément de matrice de la perturbation entre les fonctions d'ondes ψ_1 et ψ_2 ; on a $W_{12} = a d_{12}$ où a est une force fonction du temps représentant une force oscillante avec une amplitude proportionnelle à \mathcal{E} et où d_{12} est le moment dipolaire de transition : $d_{12} = \langle \psi_1, r \psi_2 \rangle$ où r est l'opérateur position. On voit sur l'eq.(5.5) que la probabilité de transition à la limite $t \rightarrow \infty$ est le module au carré de la transformée de Fourier de W_{12} (en prolongeant convenablement W_{12} pour les $t < 0$); elle est donc égale à l'intégrale sur t de $|W_{12}(t)|^2$ et donc au produit de deux facteurs :

$$P_{12}(\infty) = d_{12}^2 \bar{W} \quad (5.6)$$

où le premier facteur, carré du moment dipolaire de transition, dépend de l'atome/molécule considérée et pas des photons et le second \bar{W} est indépendant de l'atome/molécule mais dépend des photons et en particulier de la forme du pulse (ce qui est le cas ici puisqu'on étudie une évolution dans le temps).

Conclusion de la section 3.1 : la probabilité de conversion radiative A_{21} est proportionnelle à B_{21} (absorption spontanée) qui est égale à B_{12} (absorption induite), eq.(5.4). Par ailleurs B_{12} est proportionnel au carré du moment dipolaire de transition. Finalement, en comparant les eqs.(5.4) et (5.6) on trouve

$$A_{21} = \Gamma \Delta E^3 \times d^2$$

où Γ est une constante (dont la dimension est telle que celle de A_{21} soit l'inverse d'un temps) indépendante de l'atome/molécule considérée et que l'on peut déterminer empiriquement.

5.3.2 Zone de conversion radiative

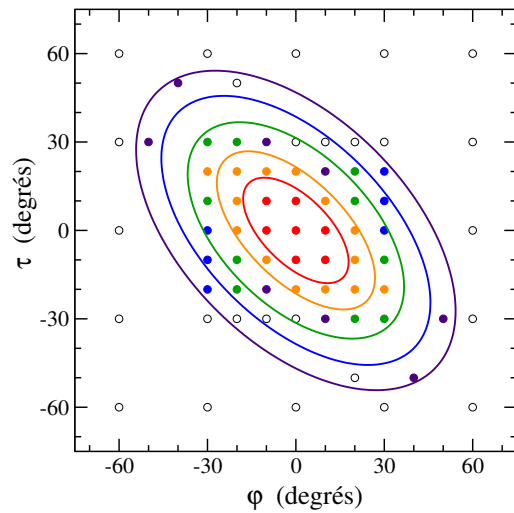
On utilise

$$P \propto \Delta E^3 d^2 \quad (5.7)$$

où ΔE est l'énergie de transition et d le vecteur dipole de transition et on évalue P à l'aide des valeurs de ΔE et de d issues des calculs CASPT2 du chromophore dans le vide[23]. On en déduit une probabilité relative (ramenée à la valeur 1 pour la géométrie plane) en fonction des angles φ et τ :

$$P(\varphi, \tau) = [\Delta E^3 dip^2]_{\varphi, \tau} / [\Delta E^3 dip^2]_{0,0} \quad (5.8)$$

Les valeurs obtenues sont représentées sur la fig. 5.4.



zone	moyennes et écarts types des probabilités relatives	
intérieur de l'ellipse rouge	.95	0.026
orangée	.78	0.072
verte	.39	0.20
bleue	.28	0.16
indigo	.15	0.11
extérieur des 5 ellipses	.023	0.026

FIGURE 5.4: Valeurs des probabilités de fluorescence déduite des calculs CASPT2[3] à l'aide de l'éq.(5.8)

à gauche : valeurs de P obtenues pour les géométries où un calcul CASPT2 a été fait et ellipses délimitant les zones où P prend différents ordres de grandeurs ;
à droite : code couleur des ellipses et des points du cadre de gauche.

Résultats :

- en dehors du carré $-60^\circ \leq \varphi, \tau \leq 60^\circ$ la probabilité relative est pratiquement nulle ($\ll 0.1$) ;
- on peut trouver des ellipses limitant 6 zones où la probabilité relative est à peu près constante ;
- dans un premier temps on se contente de l'approximation que la probabilité relative vaut 1 à l'intérieur de la sphère la plus externe de la figure 5.4 (sphère de couleur indigo) et zéro à l'extérieur.

Remarque : la comparaison des résultats des sections 2 et 3.2 fait apparaître deux points importants :

- les probabilité de transition radiative et non radiative ne sont jamais non nulles en même temps : la probabilité de transition radiative est non nulle autour de la géométrie plane, et la probabilité de transition non radiative est non nulle autour des géométries perpendiculaires (les points $\varphi = 0, |\tau| = 90^\circ$ ou $|\varphi| = 90^\circ, \tau = 0$) ;
- dans chacune de ces deux zones, on va considérer, en première approximation, que la probabilité correspondante est constante.

5.4 Résultats

Soit $S_1(t)$ le nombre de chromophores encore à l'état excité au temps t , $R(t)$ le nombre de photons émis et $N(t)$ le nombre de conversions internes qui ont eu lieu. On pose

$$\begin{aligned}\dot{S}_1 &= -p_S(t) S_1(t) \\ \dot{R} &= p_r(t) S_1(t) \\ \dot{N} &= p_{nr}(t) S_1(t)\end{aligned}$$

où les fonctions du temps p_S , p_r et p_{nr} sont des densités de probabilité *ad hoc*. La conservation du nombre de molécules implique

$$p_S = p_r + p_{nr}$$

On suppose, *hypothèse 1*, (cf. les § précédents) que les fonctions p_r et p_{nr} ne prennent chacune que 2 valeurs, respectivement 0 ou k_r et 0 ou k_{nr} comme schématisé sur la figure 5.5

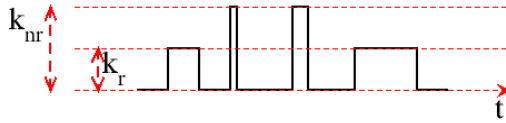


FIGURE 5.5: Types de graphes attendus pour p_r et p_{nr} et résultant de l'hypothèse 1

On suppose de plus, *hypothèse 2*, (cf. également les § précédents) que p_r et p_{nr} ne sont jamais non nuls en même temps. Il en résulte

$$\begin{aligned}-\text{Ln}(S_1) &= \int_{t:p_r \neq 0} k_r dt + \int_{t:p_{nr} \neq 0} k_{nr} dt \\ &= k_r t_r + k_{nr} t_{nr}\end{aligned}$$

où t_t et t_{nr} représentent la durée totale des intervalles de temps où, respectivement, k_r et k_{nr} ne sont pas nuls (ces deux intervalles dépendent de la durée totale de la simulation).

On obtient :

$$S_1(t) = S_1(0) \exp(-k_r t_r - k_{nr} t_{nr})$$

La figure 5.6 montrent les valeurs prises par l'angle de torsion τ en fonction de φ obtenues au cours des simulations de la GFP et de la YFP à l'état S_1 . On voit que les zones de conversion non radiative sont nettement moins peuplées que les zones de conversion radiative.

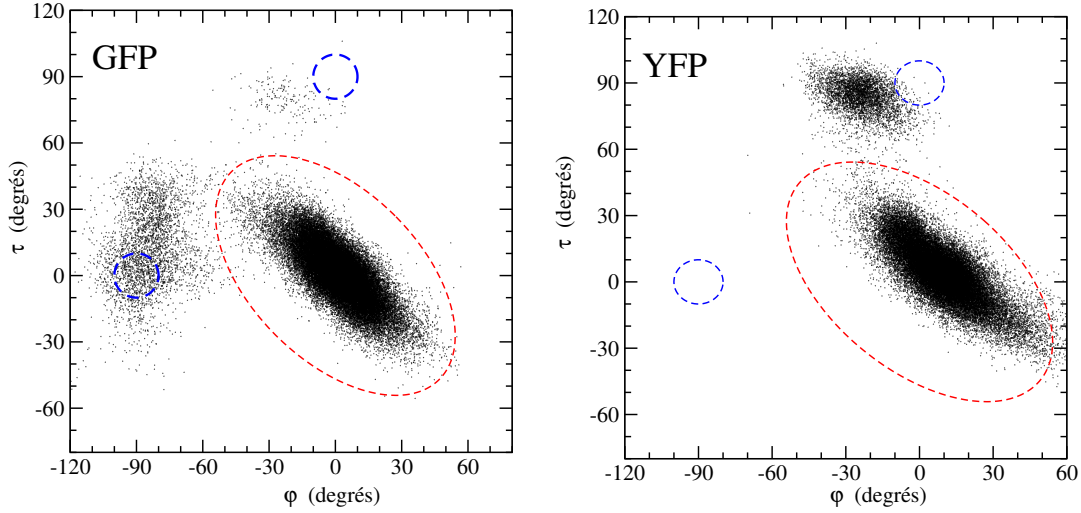


FIGURE 5.6: Corrélation entre les angles τ et φ au cours des simulations à l'état S_1 de la GFP et de la YFP. L'ellipse rouge entoure la zone de conversion radiative, les cercles verts entourent les zones de conversion non radiative.

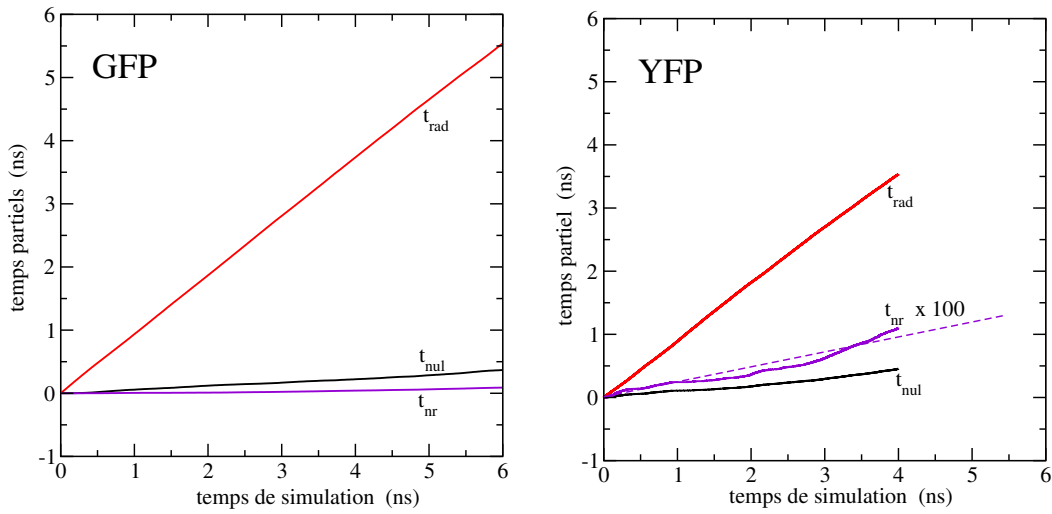


FIGURE 5.7: Valeurs de t_r et de t_{nr} obtenus par simulation dans la GFP (47 simulations de 6 ns chacune) et dans la YFP (20 simulation de 4 ns chacune)

Les valeurs de t_r et t_{nr} obtenues au cours des mêmes simulations sont montrées sur la figure 5.7. On voit que t_r et t_{nr} varient de façon quasi linéaire avec le temps (et aussi que t_{nr} est très petit, particulièrement pour la YFP) ce qui conduit à une troisième hypothèse :

On suppose maintenant, *hypothèse 3*, que t_r/t et t_{nr}/t sont indépendant du temps, ceci nous permet de définir deux nouvelles constantes \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} par les relations :

$$\begin{aligned}\bar{k}_r &= k_r t_r / t \\ \bar{k}_{nr} &= k_{nr} t_{nr} / t\end{aligned}$$

On a alors

$$S_1(t) = S_1(0) \exp [-(\bar{k}_r + \bar{k}_{nr})t]$$

Ce qui est l'expression habituelle du déclin d'une population par désexcitation radiative et non radiative. La particularité ici est que les constantes \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} sont des produits de deux facteurs : k_r et k_{nr} qui ne dépendent, *a priori*, que du chromophore et t_r/t , t_{nr}/t (supposés indépendants du temps) qui dépendent de la protéine dans laquelle se trouve le chromophore.

On en déduit les relations habituelles entre le temps moyen de fluorescence τ_{fluo} et le rendement quantique de fluorescence ϕ :

$$\tau_{fluo} = \frac{1}{\bar{k}_r + \bar{k}_{nr}}$$

$$\phi = \frac{\bar{k}_r}{\bar{k}_r + \bar{k}_{nr}}$$

Les valeurs obtenues par simulation pour les rapports des temps sont : (cf. lafigure 5.7)

$$\text{GFP : } \quad \frac{t_r}{t} = 0.92 \quad \frac{t_{nr}}{t} = 0.015$$

$$\text{YFP : } \quad \frac{t_r}{t} = 0.89 \quad \frac{t_{nr}}{t} = 0.023$$

Nous allons utiliser le cas de la GFP comme référence et en déduire des valeurs pour \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} , puis pour k_r et k_{nr} qui sont supposées indépendantes du chromophore. Puis nous utiliserons ces valeurs de k_r et k_{nr} dans le cas de la YFP.

Expérimentalement, comme on a vu dans le chapitre 1, pour la GFP on a $\tau_{fluo} = 3.0$ ns et $\phi = 0.64$

On en déduit $\bar{k}_r = 0.21 \text{ ns}^{-1}$ et $\bar{k}_{nr} = 0.12 \text{ ns}^{-1}$, puis $k_r = 0.22 \text{ ns}^{-1}$ et $k_{nr} = 8.0 \text{ ns}^{-1}$.

Partant de ces valeurs de k_r et k_{nr} , on calcule \bar{k}_r et \bar{k}_{nr} pour la YFP. On obtient ainsi :

$$\begin{aligned} \bar{k}_r &= k_r t_r/t = 0.19 \text{ ns}^{-1} \\ \bar{k}_{nr} &= k_{nr} t_{nr}/t = 0.18 \text{ ns}^{-1} \end{aligned}$$

puis, utilisant ces valeurs on calcule $\tau_{fluo} = 2.7$ ns et $\phi = 0.51$. La comparaison avec les valeurs expérimentales pour la YFP ($\tau_{fluo} = 3.7$ ns et $\phi = 0.61$) est satisfaisante pour le rendement quantique, moins pour la durée de vie de fluorescence.

On peut également comparer les résultats de ce modèle pour la YFP à ce qui avait été obtenu dans les travaux précédents du groupe [23] et que nous avons rappelé au début de ce chapitre. La valeur simulée pour τ_{nr} (l'inverse de k_{nr}) était 3.5 ns, nettement plus petit que la valeur tirée des résultats expérimentaux (9.4 ns). Avec ce nouveau modèle nous avons une amélioration significative puisque que nous obtenons une valeur égale à $\frac{1}{0.18}$ ns soit 5.5 ns.

Ce modèle pourra être perfectionné en affinant la représentation de la probabilité radiative :

nous avons les valeurs de la probabilité pour de nombreux points de l'espace φ, τ et nous pouvons donc les interpoler par une fonction analytique. Il faudra également améliorer la représentation de la probabilité non radiative.

Conclusion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à approfondir l'étude du déclin de fluorescence de la protéine YFP selon deux axes : l'amélioration du champ de force décrivant les interactions de type empilement π entre le chromophore et une tyrosine d'une part, et d'autre part, la mise au point d'un modèle décrivant le processus de déclin de fluorescence. Ainsi, nous avons calculé au niveau SA2-CAS(4,3) PT2 l'interaction entre le chromophore anionique et un phénol dans des géométries de type empilement π . Les positions relatives des deux molécules conjuguées les plus favorables énergétiquement ne correspondent pas à une superposition des deux cycles tout en donnant une stabilisation de l'ordre de 3 kcal/mole. Cela implique dans la protéine une compétition entre l'interaction chromophore-tyrosine et le réseau de liaisons hydrogène qui relie le chromophore et la tyrosine à d'autres résidus proches. La mise au point d'un nouveau champ de force interpolé sur les calculs quantiques permettra de mieux décrire cette compétition mais sans changer nécessairement la dynamique de torsion du chromophore dans les dynamiques moléculaires classiques de la YFP.

Par ailleurs, nous avons utilisé l'analyse des processus de changement d'état (radiatif ou non radiatif) développée dans le groupe ThéoSim. Elle permet de prendre en compte les variations des probabilités de conversion radiative ou non radiative en fonction des angles de torsion interne du chromophore. Appliqué au cas de la YFP sur la base de simulations moléculaires faites avec un champ de force de type AMBER, ce modèle de déclin de fluorescence par zone donne un rendement quantique et un temps de déclin de fluorescence en accord raisonnable avec les valeurs expérimentales.

Cette première approche pourra être améliorée en affinant la description des zones où se produit l'un ou l'autre des processus de désexcitation. Ce modèle ouvre la voie à une détermination rapide du temps de vie de fluorescence et du rendement quantique pour de nouvelles protéines fluorescentes sur la base de simulations moléculaires classiques.

Bibliographie

- [1] CUBITT, Andrew B. ; HEIM, Roger ; ADAMS, Stephen R. ; BOYD, Aileen E. ; GROSS, Larry A. ; TSIEN, Roger Y. : Understanding, improving and using green fluorescent proteins. In : *Trends in biochemical sciences* 20 (1995), Nr. 11, S. 448–455
- [2] NIELSEN, S B. ; LAPIERRE, A ; ANDERSEN, Jens U. ; PEDERSEN, UV ; TOMITA, S ; ANDERSEN, LH : Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore anion in vacuo. In : *Physical review letters* 87 (2001), Nr. 22, S. 228102
- [3] JONASSON, Gabriella ; TEULER, Jean-Marie ; VALLVERDU, Germain ; MÉROLA, Fabienne ; RIDDARD, Jacqueline ; LÉVY, Bernard ; DEMACHY, Isabelle : Excited state dynamics of the green fluorescent protein on the nanosecond time scale. In : *Journal of Chemical Theory and Computation* 7 (2011), Nr. 6, S. 1990–1997
- [4] SHIMOMURA, Osamu ; JOHNSON, Frank H. ; SAIGA, Yo : Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. In : *Journal of cellular and comparative physiology* 59 (1962), Nr. 3, S. 223–239
- [5] PRASHER, Douglas C. ; ECKENRODE, Virginia K. ; WARD, William W. ; PRENDERGAST, Frank G. ; CORMIER, Milton J. : Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. In : *Gene* 111 (1992), Nr. 2, S. 229–233
- [6] CHALFIE, Martin ; TU, Yuan ; EUSKIRCHEN, Ghia ; WARD, William W. ; PRASHER, Douglas C. : Green fluorescent protein as a marker for gene expression. In : *Science* 263 (1994), Nr. 5148, S. 802–805
- [7] JOHNSON, Frank H. ; SHIMOMURA, Osamu ; SAIGA, Yo ; GERSHMAN, Lewis C. ; REYNOLDS, George T. ; WATERS, John R. : Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea. In : *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 60 (1962), Nr. 1, S. 85–103
- [8] TSIEN, Roger Y. : The green fluorescent protein. In : *Annual review of biochemistry* 67 (1998), Nr. 1, S. 509–544
- [9] WANG, Lei ; JACKSON, W C. ; STEINBACH, Paul A. ; TSIEN, Roger Y. : Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Nr. 48, S. 16745–16749

- [10] SHANER, Nathan C. ; CAMPBELL, Robert E. ; STEINBACH, Paul A. ; GIEPMANS, Ben N. ; PALMER, Amy E. ; TSIEN, Roger Y. : Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. In : *Nature biotechnology* 22 (2004), Nr. 12, S. 1567–1572
- [11] SALIH, Anya ; LARKUM, Anthony ; COX, Guy ; KÜHL, Michael ; HOEGH-GULDBERG, Ove : Fluorescent pigments in corals are photoprotective. In : *Nature* 408 (2000), Nr. 6814, S. 850–853
- [12] DEHEYN, Dimitri D. ; KUBOKAWA, Kaoru ; MCCARTHY, James K. ; MURAKAMI, Akio ; PORRACHIA, Magali ; ROUSE, Greg W. ; HOLLAND, Nicholas D. : Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus. In : *The Biological Bulletin* 213 (2007), Nr. 2, S. 95–100
- [13] JÄHRLING, Nina ; SAGHAFI, Saiedeh : Ultramicroscopy—a novel light sheet based imaging technique created by various research disciplines. In : *e & i Elektrotechnik und Informationstechnik* 128 (2011), Nr. 10, S. 352–358
- [14] GUBIN, Alexander N. ; REDDY, Bindu ; NJOROGI, Joyce M. ; MILLER, Jeffery L. : Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. In : *Biochemical and biophysical research communications* 236 (1997), Nr. 2, S. 347–350
- [15] PISTON, David W. ; KREMERS, Gert-Jan : Fluorescent protein FRET : the good, the bad and the ugly. In : *Trends in biochemical sciences* 32 (2007), Nr. 9, S. 407–414
- [16] FÖRSTER, Th : Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. In : *Annalen der physik* 437 (1948), Nr. 1-2, S. 55–75
- [17] SNIEGOWSKI, Jennifer A. ; LAPPE, Jason W. ; PATEL, Hetal N. ; HUFFMAN, Holly A. ; Wächter, Rebekka M. : Base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein. In : *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr. 28, S. 26248–26255
- [18] WOOD, Timothy I. ; BARONDEAU, David P. ; HITOMI, Chiharu ; KASSMANN, Carey J. ; TANNER, John A. ; GETZOFF, Elizabeth D. : Defining the role of arginine 96 in green fluorescent protein fluorophore biosynthesis. In : *Biochemistry* 44 (2005), Nr. 49, S. 16211–16220
- [19] WARD, William W. ; PRENTICE, Hugh J. ; ROTH, Amy F. ; CODY, Chris W. ; REEVES, Sue C. : SPECTRAL PERTURBATIONS OF THE AEQUOREA GREEN-FLUORESCENT PROTEIN. In : *Photochemistry and photobiology* 35 (1982), Nr. 6, S. 803–808
- [20] BREJC, Katjuša ; SIXMA, Titia K. ; KITTS, Paul A. ; KAIN, Steven R. ; TSIEN, Roger Y. ; ORMÖ, Mats ; REMINGTON, S J. : Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), Nr. 6, S. 2306–2311

- [21] CHATTORAJ, Mita ; KING, Brett A. ; BUBLITZ, Gerold U. ; BOXER, Steven G. : Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein : multiple states and proton transfer. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (1996), Nr. 16, S. 8362–8367
- [22] MEROLA, Fabienne ; LEVY, Bernard ; DEMACHY, Isabelle ; PASQUIER, Helene : Photophysics and spectroscopy of fluorophores in the green fluorescent protein family. In : *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I*. Springer, 2010, S. 347–383
- [23] JONASSON, Gabriella : *Etude théorique de l'extinction de fluorescence des protéines fluorescentes : champ de forces, mécanisme moléculaire et modèle cinétique*, Paris 11, Diss., 2012
- [24] ORMÖ, Mats ; CUBITT, Andrew B. ; KALLIO, Karen ; GROSS, Larry A. ; TSIEN, Roger Y. ; REMINGTON, S J. : Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. In : *Science* 273 (1996), Nr. 5280, S. 1392–1395
- [25] WACHTER, Rebekka M. ; ELSLIGER, Marc-André ; KALLIO, Karen ; HANSON, George T. ; REMINGTON, S J. : Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. In : *Structure* 6 (1998), Nr. 10, S. 1267–1277
- [26] LAKOWICZ, J.R. : *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum, 1999. – ISBN 9780306460937
- [27] PRASHER, Douglas C. : Using GFP to see the light. In : *Trends in Genetics* 11 (1995), Nr. 8, S. 320–323
- [28] GERDES, Hans-Hermann ; KAETHER, Christoph : Green fluorescent protein : applications in cell biology. In : *FEBS letters* 389 (1996), Nr. 1, S. 44–47
- [29] HEIM, Roger ; PRASHER, Douglas C. ; TSIEN, Roger Y. : Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1994), Nr. 26, S. 12501–12504
- [30] CHUDAKOV, Dmitriy M. ; LUKYANOV, Sergey ; LUKYANOV, Konstantin A. : Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. In : *Trends in biotechnology* 23 (2005), Nr. 12, S. 605–613
- [31] WACHTER, Rebekka M. : The Family of GFP-Like Proteins : Structure, Function, Photophysics and Biosensor Applications. Introduction and Perspective. In : *Photochemistry and photobiology* 82 (2006), Nr. 2, S. 339–344
- [32] NIENHAUS, G U. ; WIEDENMANN, Jörg : Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins : perspectives for marker development. In : *ChemPhysChem* 10 (2009), Nr. 9-10, S. 1369–1379

- [33] HEIM, Roger ; TSIEN, Roger Y. : Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. In : *Current Biology* 6 (1996), Nr. 2, S. 178–182
- [34] MITRAA, Robi D. ; SILVAB, Christopher M. ; YOUVANB, Douglas C. : Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. In : *Gene* 173 (1996), Nr. 13, S. 17
- [35] MIYAWAKI, Atsushi ; LLOPIS, Juan ; HEIM, Roger ; MCCAFFERY, J M. ; ADAMS, Joseph A. ; IKURA, Mitsuhiro ; TSIEN, Roger Y. : Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. In : *Nature* 388 (1997), Nr. 6645, S. 882–887
- [36] ROMOSER, Valerie A. ; HINKLE, Patricia M. ; PERSECHINI, Anthony : Detection in living cells of Ca^{2+} -dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence A new class of fluorescent indicators. In : *Journal of biological chemistry* 272 (1997), Nr. 20, S. 13270–13274
- [37] POLYAKOV, IV ; GRIGORENKO, BL ; EPIFANOVSKY, EM ; KRYLOV, AI ; NEMUKHIN, AV : Potential energy landscape of the electronic states of the GFP chromophore in different protonation forms : electronic transition energies and conical intersections. In : *Journal of Chemical Theory and Computation* 6 (2010), Nr. 8, S. 2377–2387
- [38] TONIOLO, A ; OLSEN, S ; MANOHAR, L ; MARTINEZ, TJ : Conical intersection dynamics in solution : the chromophore of green fluorescent protein. In : *Faraday discussions* 127 (2004), S. 149–163
- [39] MARTIN, María Elena ; NEGRI, Fabrizia ; OLIVUCCI, Massimo : Origin, nature, and fate of the fluorescent state of the green fluorescent protein chromophore at the CASPT2//CASSCF resolution. In : *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 17, S. 5452–5464
- [40] OLSEN, Seth ; SMITH, Sean C. : Bond selection in the photoisomerization reaction of anionic green fluorescent protein and kindling fluorescent protein chromophore models. In : *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008), Nr. 27, S. 8677–8689
- [41] SCHWILLE, Petra ; KUMMER, Susanne ; HEIKAL, Ahmed A. ; MOERNER, WE ; WEBB, Watt W. : Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), Nr. 1, S. 151–156
- [42] SCHRÖDINGER, Erwin : Über das Verhältnis der Heisenberg-Born-Jordanschen Quantenmechanik zu der meinem. In : *Annalen der Physik* 384 (1926), Nr. 8, S. 734–756

- [43] BORN, Max ; OPPENHEIMER, Robert : Zur quantentheorie der molekeln. In : *Annalen der Physik* 389 (1927), Nr. 20, S. 457–484
- [44] HARTREE, Douglas R. : The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field. Part I. Theory and methods. In : *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* Bd. 24 Cambridge Univ Press, 1928, S. 89–110
- [45] FOCK, V : Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. In : *Zeitschrift für Physik* 61 (1930), Nr. 1-2, S. 126–148
- [46] SLATER, JC : The Theory of Complex Spectra. In : *Physical Review* 34 (1929), Nr. 10, S. 1293
- [47] Roothaan, Clemens Carel J. : New developments in molecular orbital theory. In : *Reviews of modern physics* 23 (1951), Nr. 2, S. 69
- [48] HALL, George G. : The molecular orbital theory of chemical valency. VIII. A method of calculating ionization potentials. In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 205 (1951), Nr. 1083, S. 541–552
- [49] KUTZELNIGG, Werner : Friedrich Hund and chemistry. In : *Angewandte Chemie International Edition in English* 35 (1996), Nr. 6, S. 572–586
- [50] MULLIKEN, Robert S. : *Spectroscopy, molecular orbitals, and chemical bonding*. Laboratory of Molecular Structure and Spectra, University of Chicago, 1967
- [51] LÖWDIN, Per-Olov : Quantum theory of many-particle systems. I. Physical interpretations by means of density matrices, natural spin-orbitals, and convergence problems in the method of configurational interaction. In : *Physical Review* 97 (1955), Nr. 6, S. 1474
- [52] FRENKEL, J. ; OXFORD, Clarendon (Hrsg.) : *Wave Mechanics, Advanced General Theory*. 1934
- [53] SIEGBAHN, Per E. ; ALMLÖF, Jan ; HEIBERG, Anders ; ROOS, Björn O : The complete active space SCF (CASSCF) method in a Newton–Raphson formulation with application to the HNO molecule. In : *The Journal of Chemical Physics* 74 (1981), Nr. 4, S. 2384–2396
- [54] ROOS, Björn O ; TAYLOR, Peter R. ; SI, Per E. u. a. : A complete active space SCF method (CASSCF) using a density matrix formulated super-CI approach. In : *Chemical Physics* 48 (1980), Nr. 2, S. 157–173
- [55] RUEDENBERG, Klaus ; SCHMIDT, Michael W. ; GILBERT, Mary M. : Are atoms sic to molecular electronic wavefunctions ? II. Analysis of fors orbitals. In : *Chemical Physics* 71 (1982), Nr. 1, S. 51–64

- [56] RUEDENBERG, Klaus ; SCHMIDT, Michael W. ; GILBERT, Mary M. ; ELBERT, ST : Are atoms intrinsic to molecular electronic wavefunctions ? I. The FORS model. In : *Chemical Physics* 71 (1982), Nr. 1, S. 41–49
- [57] HOHENBERG, Pierre ; KOHN, Walter : Inhomogeneous electron gas. In : *Physical review* 136 (1964), Nr. 3B, S. B864
- [58] KOHN, Walter ; SHAM, Lu J. : Self-consistent equations including exchange and correlation effects. In : *Physical Review* 140 (1965), Nr. 4A, S. A1133
- [59] BOYS, S.F. ; BERNARDI, F. : The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. In : *Molecular Physics* 19 (1970), Nr. 4, S. 553–566
- [60] OLSEN, Seth ; MCKENZIE, Ross H. : A diabatic three-state representation of photoisomerization in the green fluorescent protein chromophore. In : *The Journal of chemical physics* 130 (2009), Nr. 18, S. 184302
- [61] OLSEN, Seth : A Modified Resonance-Theoretic Framework for Structure- Property Relationships in a Halochromic Oxonol Dye. In : *Journal of Chemical Theory and Computation* 6 (2010), Nr. 4, S. 1089–1103
- [62] BRAIDA, Benoit ; WALTER, Christof ; ENGELS, Bernd ; HIBERTY, Philippe C. : A clear correlation between the diradical character of 1, 3-dipoles and their reactivity toward ethylene or acetylene. In : *Journal of the American Chemical Society* 132 (2010), Nr. 22, S. 7631–7637
- [63] WERNER, H.-J. ; KNOWLES, P. J. ; KNIZIA, G. ; MANBY, F. R. ; SCHÜTZ, M. ; CELANI, P. ; KORONA, T. ; LINDH, R. ; MITRUSHENKOV, A. ; RAUHUT, G. ; SHAMASUNDAR, K. R. ; ADLER, T. B. ; AMOS, R. D. ; BERNHARDSSON, A. ; BERNING, A. ; COOPER, D. L. ; DEEGAN, M. J. O. ; DOBBYN, A. J. ; ECKERT, F. ; GOLL, E. ; HAMPEL, C. ; HESSELMANN, A. ; HETZER, G. ; HRENAR, T. ; JANSEN, G. ; KÖPPL, C. ; LIU, Y. ; LLOYD, A. W. ; MATA, R. A. ; MAY, A. J. ; McNICHOLAS, S. J. ; MEYER, W. ; MURA, M. E. ; NICKLASS, A. ; O'NEILL, D. P. ; PALMIERI, P. ; PENG, D. ; PFLÜGER, K. ; PITZER, R. ; REIHER, M. ; SHIOZAKI, T. ; STOLL, H. ; STONE, A. J. ; TARRONI, R. ; THORSTEINSSON, T. ; WANG, M. : *MOLPRO, version 2006.1, a package of ab initio programs*. 2006. – see
- [64] FILIPPI, Claudia ; ZACCHEDDU, Maurizio ; BUDA, Francesco : Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore : a difficult case for ab initio methods ? In : *Journal of Chemical Theory and Computation* 5 (2009), Nr. 8, S. 2074–2087
- [65] B.LÉVY ; B.WENDE (Hrsg.) : *Spectral Line Shapes*. 1981
- [66] BAER, Michael : Adiabatic and diabatic representations for atom-molecule collisions : Treatment of the collinear arrangement. In : *Chemical Physics Letters* 35 (1975), Nr. 1, S. 112–118

- [67] BOLTZMANN, Ludwig : *Über die mechanische Bedeutung des zweiten Hauptsatzes der Wärmetheorie* :(vorgelegt in der Sitzung am 8. Februar 1866). Staatsdruckerei, 1866
- [68] PLANCK, Max : On an Improvement of Wiens Equation for the Spectrum. In : *Verh. Deut. Phys. Ges* 2 (1900), S. 202–204
- [69] PLANCK, MKEL : Distribution of energy in the normal spectrum. In : *Verhandlungen der Deutschen Physikalischen Gesellschaft* 2 (1900), S. 237–245
- [70] EINSTEIN, Albert : Über einem die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. In : *Annalen der Physik* 4 (1905)
- [71] *Kapitel XIII.* In : C.COHEN-TANNOUDJI, F.Laloë B.Diu : *Mécanique Quantique.* 1973

Titre : *Yellow Fluorescent Protein* : étude du π -stacking; élaboration d'un modèle du déclin de fluorescence

Mots clés : Champs de force, amber, chromophore, YFP, CASPT2

Résumé : Mon travail de thèse concerne l'étude théorique de la protéine fluorescente jaune (YFP) et l'effet de l'environnement sur la longueur d'onde de fluorescence.

Les protéines fluorescentes sont des substances naturellement présentes dans les méduses, les coraux, les anémones de mer et quelques autres organismes. Elles sont utilisées au laboratoire comme sondes chimiques capables de mesurer la température ou le pH local, la distance entre protéines etc ... Elles constituent aussi l'un des supports possibles de l'ultra microscopie.

Dans la protéine fluorescente jaune l'énergie de transition électronique est réduite par rapport à celle de la protéine fluorescente verte (GFP) en raison de l'influence de l'empilement π entre le chromophore (la partie qui absorbe et émet au cœur de la protéine) et une tyrosine, cette effet constitue la base de son utilité au laboratoire

(transfert d'énergie par résonance «FRET» avec d'autres protéines).

L'approche effectuée ici combine des méthodes de dynamique moléculaire et de chimie quantique pour étudier l'état excité où l'effet de l'empilement π est mal décrit par les champs de force standards.

Dans un premier temps on calcule l'énergie d'interaction entre le chromophore et la tyrosine à l'état fondamental et à l'état excité avec une méthode quantique qui prend en considération la corrélation électronique CASPT2 ainsi que la correction de l'erreur due à une base finie (BSSE).

Puis on doit déterminer les nouveaux paramètres du champ de force en interpolant les résultats obtenus et de refaire une dynamique avec ce champ de force.

Title : *Yellow Fluorescent Protein* : study of π -stacking; development of a model of the fluorescence decay

Keywords : Force Fields, amber, chromophore, YFP, CASPT2

Abstract: My thesis work concerns the theoretical study of the yellow fluorescent protein (YFP) and the effect of the environment on the fluorescence wavelength.

Fluorescent proteins are naturally occurring substances in the jellyfish, corals, sea anemones and some other living organism. They are used in the laboratory as chemical sensors capable of measuring local temperature or the local pH, distances between proteins etc ... They are also one of the possible carriers of ultra microscopy.

In the yellow fluorescent protein, electron transition energy is reduced relative to that of the green fluorescent protein (GFP) due to the influence of π stacking between the chromophore (the part that absorbs and emits light) and a tyrosine.

This effect is the basis of its use in the laboratory (by resonance energy transfer "FRET" with other proteins).

The approach used here combines molecular dynamics and quantum chemistry methods to study the excited state in which the effect of π stacking is poorly described by standard force fields.

First we calculate the energy of interaction between the chromophore and tyrosine in the ground state and the excited state with quantum method that takes into account the electron correlation CASPT2 as well as the correction of the error due using a finite basis (BSSE).

Then we have must determine new force field parameters by interpolating the quantum results and use them in molecular dynamics simulation.

